

03/35828

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 2 月 22 日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/12808 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12Q 1/02, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05552
- (22) 国際出願日: 2000 年 8 月 18 日 (18.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/232018 1999 年 8 月 18 日 (18.08.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社  
中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.) [JP/JP];  
〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 妹尾千明 (SENOO, Chiaki) [JP/JP]. 沼田真理子 (NUMATA, Mariko) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 清水初志. 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

Best Available Copy

(54) Title: NOVEL FRIZZLED FAMILY GENES 584

(54) 発明の名称: 新規 frizzled ファミリー遺伝子、584

(57) Abstract: Novel frizzled family genes "584" successfully isolated from cDNAs originating in mouse and humans. These genes are strongly expressed in embryos and fetes. Also, strong expression is observed in cancer cells. The proteins and genes encoding the same are usable as a tool for developing drugs for diseases including tumor.

(57) 要約:

マウスおよびヒト由来 cDNA から、新規な frizzled ファミリー遺伝子「584」を単離することに成功した。これらの遺伝子は、胚や胎児で強く発現していた。また、癌細胞においても高い発現が見られた。本発明のタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子は、腫瘍を含む疾患に対する医薬品開発のためのツールとして利用することが可能である。

WO 01/12808 A1

- 1 -

## 明細書

## 新規 frizzled ファミリー遺伝子、584

技術分野

本発明は、frizzled ファミリーに属する新規なタンパク質およびその遺伝子に関する。これら分子は、例えば、医薬品開発の分野において利用しうる。

背景技術

ショウジョウバエの wingless (Wg) は、体軸および体節形成や、中枢神経発生に関与する遺伝子として同定されたセグメントポーラリティー遺伝子の一つであり、この Wg ホモログ (Wnt) は線虫から哺乳動物にいたる様々な種で広く保存されている (Wodarz, A. and Nusse, R. (1998) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14, 59-88; Dale, T. C. (1998) *Biochem. J.* 329, 209-23; Cadigan, K. M. and Nusse, R. (1997) *Genes Dev.* 11, 3286-305)。マウスにおいては約 20 種類のホモログが報告されており、例えば Wnt-1 は中脳形成に (McMahon, A. P. et al. (1992) *Cell* 69, 581-95)、Wnt-3a は体節中胚葉誘導に (Takada, S. et al. (1994) *Genes Dev.* 8, 174-89)、Wnt-4 は腎臓形成に (Stark, K. et al. (1994) *Nature* 372, 679-83)、そして Wnt-7a は雌生殖器形成に関与すること (Parr, B. A., McMahon, A. P. (1998) *Nature* 395, 707-10) が知られている。また、カエルでは Xwnt の体軸形成関与が明らかになっている (Sokol, S. et al. (1991) *Cell* 67, 741-52; Smith, W. C. and Harland, R. M. (1991) *Cell* 67, 753-65)。体軸形成 (頭尾、背腹、左右) は初期発生において非常に重要であり、Wnt/Wg シグナル伝達が発生にどのように関与しているかという点は興味深い。

Wnt/Wg は分泌型のタンパク質であり、そのレセプターはショウジョウバエのセグメントポーラリティー遺伝子の一つとして知られていた frizzled である

(Bhanot, P. et al. (1996) *Nature* 382, 225-30)。frizzled も下等生物から哺乳類まで広く保存されており、マウスではそのファミリーが9種類報告されている (Chan, S. D. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25202-7; Wang, Y. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 4468-76; Wang, Y. K. et al. (1999) *Genomics* 57, 235-48)。このファミリーのタンパク質の構造上の特徴は、1) N末端にシグナルシーケンスと思われる配列を有する、2) 7回膜貫通領域を持ち、N末端領域は細胞外に、C末端領域は細胞内に存在する、3) N末側細胞外領域にシステインリッチドメイン (cystein rich domain; CRD) を持つ、4) 第1および第2細胞外領域ループに保存されたシステイン残基が存在する、5) C末端 (細胞内) にPDZ結合モチーフと思われる配列を有する、である。Wnt/Wgとの結合はCRDが担っていると考えられている (Bhanot, P. et al. (1996) *Nature* 382, 225-30)。また、細胞内領域を介してその下流に位置するDishevelled (ショウジョウバエ; Dsh, 哺乳動物のホモログ; Dvl) にシグナルを伝達していると思われるが、その詳細は不明である (Krasnow, R. E. et al. (1995) *Development* 121, 4095-102)。

哺乳動物において、Wntのシグナルは次のように伝達されていると考えられている (Dierick, H. and Bejsovec, A. (1999) *Curr. Top. Dev. Biol.* 43, 153-90; Willert, K. and Nusse, R. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 95-102; Kikuchi, A. (1998) *Jikken Igaku* 16, 2173-9)。Wntのシグナルがない状態ではグリコーゲン合成酵素キナーゼ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; GSK-3 $\beta$ ) はキナーゼ活性を持ち、癌抑制遺伝子APC、 $\beta$ -カテニンおよびaxinをリン酸化する。リン酸化されたAPC、 $\beta$ -カテニンおよびaxinは複合体を形成し、ユビキチンを介しプロテアソームにより分解される。一方Wntが存在する場合、このシグナルはFrizzledを介してDvlに伝わる。DvlはPDZモチーフを持つタンパク質で、活性化されるとGSK-3 $\beta$ のキナーゼ活性を抑制する。これによってAPC、 $\beta$ -カテニンおよびaxinはリン酸化されないためプロテアソームによって分解されず、細胞内に $\beta$ -カテニンが蓄積することになる。この蓄積された $\beta$ -カテニンは転写因子

である Tcf / Lef と結合し、核内へと移行し Tcf / Lef 制御下の遺伝子を発現する。このシグナル伝達系に関与している各分子のホモログは、哺乳動物だけでなく線虫を始めショウジョウバエやカエルにおいても存在し、Wnt - Frizzled シグナル伝達系が様々な生物種において保存されていることが知られている (Dale, T. C. (1998) *Biochem. J.* 329, 209-23; Cadigan, K. M. and Nusse, R. (1997) *Genes Dev.* 11, 3286-305)。

癌抑制遺伝子 APC は家族性腺腫性ポリポシス (familial adenomatous polyposis; FAP) の原因遺伝子として知られており、さらに散発性大腸癌の約 70% で変異が確認されている (Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996) *Cell* 87, 159-70; Kartheuser, A. et al. (1995) *Acta Gastroenterol.* 58, 433-51)。また、大腸癌やメラノーマにおいては、 $\beta$ -カテニンの変異が見いだされている (Morin, P. J. et al. (1997) *Science* 275, 1787-90; Rubinfeld, B. et al. (1997) *Science* 275, 1790-2)。こういったことより、Wnt/Wg - Frizzled のシグナル伝達系が、生物の発生のみならず癌化にも関与している事が示唆されている。

未分化なマウス胚性腫瘍細胞株 (embryonal carcinoma cell line) P19 は種々の刺激 (DMSO、レチノイン酸等) を加えることで、様々な種類の神経細胞、平滑筋細胞あるいは心筋細胞等へと分化誘導を行うことができる (Bain, G. et al. (1994) *Bioessays* 16, 343-8; McBurney, M. W. (1993) *Int. J. Dev. Biol.* 37, 135-40)。CL6 細胞は P19 より樹立された未分化な細胞株である (Habara-Ohkubo, A. (1996) *Cell Struct. Funct.* 21, 101-10)。P19 は浮遊条件で培養し、類胚体 (embryonal body) を形成させ分化誘導を行う必要があるのに対し、この CL6 細胞は付着条件で細胞培養培地に 1% の DMSO を添加することによって、効率良く心筋様細胞へと分化誘導を行うことが可能である。CL6 細胞は、1% DMSO の刺激を加えた後約 8 日で cardiac  $\alpha$  および  $\beta$ -MHC といった心筋遺伝子を発現し、刺激後約 10 日でシンクロナイズした拍動を開始する。これまでに心筋の分化や、発生における心臓形成に関与する遺伝子は数多く知られている (Grepin, C. et al.

(1995) Mol. Cell. Biol. 15, 4095-102; Kuo, C. T. et al. (1997) Genes Dev. 11, 1048-60; Lyons, I. et al. (1995) Genes 9, 1654-66; Lin, Q. et al. (1997) Science 276, 1404-7; Srivastava, D. et al. (1997) Nat. Genet. 16, 154-60; Riley, P. et al. (1998) Nat. Genet. 18, 271-5; de la Pompa, J. L. et al. (1998) Nature 1998 392, 182-6)。しかし、未分化細胞を心筋または心筋前駆体細胞へ分化誘導できるような鍵となる遺伝子は見いだされていない。心筋細胞分化等の分化誘導や発癌を制御しうる新たな分子の単離は、これまでにない医薬品の開発のための重要なステップになると考えられる。

#### 発明の開示

心筋分化に関連する遺伝子を探索するために、本発明者らは、未分化な CL6 細胞と、CL6 細胞培養系に 1% DMSO を加えてから 4 日後の細胞の polyA<sup>+</sup> RNA を用いて、サブトラクション法で分化誘導直後に発現の上昇する多数の遺伝子断片を単離した。単離した遺伝子断片につき塩基配列を解析した結果、その中の 1 つ (PS40-584) が発生において重要な役割を果たしている Wnt のレセプターである frizzled ファミリー遺伝子と、その一部の領域において高い相同性を有していた。そこで次に、全 ORF を含む cDNA 「584」のクローニングを行った。

マウス「584」遺伝子 (m584) は 582 アミノ酸をコードすると予想される (配列番号: 2)。このアミノ酸配列は、既知の frizzled ファミリー遺伝子と相同性を持つが完全に一致はしないので、新規な frizzled ファミリー遺伝子であることが判明した。「m584」は既知の frizzled ファミリー遺伝子と同様、N 末端にシグナルペプチドと思われる領域を持ち、それに引き続き細胞外システインリッチドメイン (cystein rich domain; CRD)、7 回膜貫通領域があり、C 末端には PDZ 結合モチーフと思われる配列が存在する。

CL6 細胞の DMSO 刺激による分化誘導過程での「m584」の発現を解析したところ、分化誘導直後に一過性に発現が上昇しており、心筋の分化や心臓の形成への関与

が示唆された。既知の frizzled ファミリー遺伝子と相同性の低い領域で「m584」のプロープを作成し、ノーザンブロットによる解析を行った結果、11 日目胚、15 日目胚および 17 日目胚においてこの遺伝子の発現が確認できたが、7 日目胚や成体マウスでは発現を確認できなかった。このため、該遺伝子が、発生の中期から後期に機能していることが示唆される。

「m584」のヒトカウンターパートであるヒト「584」遺伝子 (h584) の全 ORF を含む cDNA を、「m584」の塩基配列を基に、RT-PCR および RACE 法によってクローニングした。「h584」は 581 アミノ酸をコードすると予想される (配列番号: 4)。取得できた「h584」を「m584」と比較すると、コーディング領域での核酸配列で 86.9%、アミノ酸配列で 92.8%の相同性を示した。

「h584」のプロープを用いてノーザンブロットによる解析を行ったところ、胎児期においては脳、心臓、小腸、筋肉、肺および腎臓で、成体では小腸、肺、前立腺、子宮および胎盤において発現していることが判明した (これらの中では成体胎盤での発現がもっとも強い)。興味深いことに子宮頸癌細胞株である HeLa S3 において、「h584」は非常に高レベルで発現していた。次に、RT-PCR によって子宮頸癌、前立腺癌、卵巣癌等の生殖関連組織のヒト癌細胞株における「h584」の発現を調べた。その結果、いくつかの子宮頸癌細胞株において「h584」の高発現が認められた。しかし、塩基配列を決定したところ、アミノ酸レベルでの変異はないことがわかった。

Wnt - Frizzled シグナル伝達経路には癌抑制遺伝子である APC (adenomatous polyposis coli) や、一部の大腸癌で変異が見られる  $\beta$ -カテニンが含まれることが知られている。単離された新規 frizzled ファミリー遺伝子「584」は、発生における関与のみならず、癌化についても関与している可能性を持つ。

従って、本発明の「584」タンパク質は、発生や器官形成、癌化や腫瘍の増殖を制御するための新しい因子として有用であるほか、発生段階や細胞分化を測定するためのマーカーとして利用することが可能である。さらに、「584」タンパク質

が関与する種々の疾患に対する医薬品開発のための標的としても有用であると考えられる。

本発明は新規な Frizzled ファミリータンパク質「584」およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(b) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(c) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

(2) (1) に記載の DNA によりコードされるタンパク質、

(3) (1) に記載の DNA が挿入されたベクター、

(4) (3) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(5) (4) に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(2) に記載のタンパク質の製造方法、

(6) (2) に記載のタンパク質の部分ペプチド、

(7) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、

(8) (2) に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出す

- 7 -

る工程、

(c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(9) (2) に記載のタンパク質に結合する化合物、

(10) 抗体である、(9) に記載の化合物、

(11) (8) に記載の方法により単離されうる、(2) に記載のタンパク質に結合する化合物、

(12) (1) に記載の DNA の発現を調節する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該 DNA を内因的に発現する細胞に被検試料を接触させる工程、

(b) 該発現を検出する工程、

(c) 被検試料を該細胞に接触させない場合と比較して、該発現を促進または阻害する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) (12) に記載の方法により単離されうる、(1) に記載の DNA の発現を調節する化合物、に関する。

本発明は、新規 Frizzled ファミリータンパク質「584」および該タンパク質をコードする DNA を提供する。本発明者らにより単離されたマウス Frizzled ファミリータンパク質「m584」の cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、該 cDNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。また「m584」のヒトカウンターパートである「h584」の cDNA の塩基配列を配列番号：3 に、該 cDNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4 に示す。

「m584」は、DMSO 添加により心筋様細胞へ分化誘導した CL6 細胞と、未分化な CL6 細胞とのサブトラクションにより同定された。「m584」タンパク質は 582 アミノ酸をコードすると予想され、このアミノ酸配列は、発生において重要な役割を果たしている Wnt のレセプターである、frizzled ファミリー遺伝子と高い相同性を持っていた。



frizzled はセグメントポーラリティー遺伝子 Wnt のレセプターであり、生物の体軸形成を含む初期発生や器官形成等に重要な役割を果たしている事が示唆されている。「m584」は既知の frizzled ファミリー遺伝子と同様、N 末端にシグナルペプチドと思われる領域を持ち、それに引き続き細胞外システインリッチドメイン (cystein rich domain; CRD)、および 7 回膜貫通領域があり、C 末端には PDZ 結合モチーフと思われる配列が存在する。CL6 細胞の DMSO 刺激による分化誘導過程では、分化誘導直後に「m584」の発現が一過性に上昇していることから、心筋の分化や心臓の形成への関与が示唆される。またノーザンブロットによる解析では、11 日目胚、15 日目胚および 17 日目胚においてこの遺伝子の発現が確認できた。一方、「h584」は 581 アミノ酸をコードすると予想され、コーディング領域での核酸配列で「m584」と 86.9%、アミノ酸配列で 92.8%の相同性を持つ。「h584」は、胎児期においては脳、心臓、小腸、筋肉、肺および腎臓で、成体では小腸、肺、前立腺、子宮および胎盤において発現していた。これらのことから、発生時における「584」の関与が示唆される。

哺乳動物において、Frizzled のリガンドである Wnt は、mouse mammary tumor virus (MMTV)によって活性化される癌遺伝子 int1 として見いだされた。Wnt - Frizzled シグナル伝達経路には癌抑制遺伝子である APC (adenomatous polyposis coli) や、一部の结肠癌で変異が見られる  $\beta$ -カテニンが含まれることが知られており、Wnt - Frizzled を介したシグナルと腫瘍化の関与が強く示唆されている。ノーザンブロットによる解析の結果、「h584」は子宮頸癌由来細胞株 HeLa S3 において非常に強く発現しており、また「h584」に一致する EST のうち、いくつかのものが卵巣腫瘍 (ovary tumor) および肺カルシノイド (lung carcinoid) 由来のものであった。また RT-PCR による解析の結果、いくつかの子宮頸癌細胞株でも高い発現が見られた。これら癌細胞株における h584 の塩基配列を決定した結果、アミノ酸レベルでの置換や欠損/付加を伴う変異は認められなかった。このことは、これらの癌細胞株において 584 遺伝子が高頻度に発現上昇しているものの、遺伝

子産物自体は正常な機能を持つことが示唆される。他方、いくつかの子宮頸癌細胞株における h584 の発現上昇は、遺伝子の発現調節レベルにおいての何らかの変異の存在を示唆するものである。また特に子宮頸癌細胞株 HeLa S3 で高発現が認められることは、パピローマウイルス感染との関連も示唆され、ウイルスによる転写因子活性化機構の存在も考えられる。これら事実から、本発明の新規 frizzled ファミリー遺伝子「584」は、発生のみならず、腫瘍形成にも関与していることが示唆される。本発明の「584」タンパク質および該タンパク質をコードする DNA は、発生や器官形成を制御するための因子や分化マーカーとして有用であるほか、腫瘍を含む、発生分化が関与する疾患の診断、予防、および治療への応用も可能であると考えられる。本発明により、本発明の「584」遺伝子がコードするタンパク質そのものや、その上流または下流の分子を標的とした増殖性疾患の薬剤、特に抗癌剤のスクリーニング系の構築が可能となる。

本発明は、また、ヒトおよびマウス「584」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。このようなタンパク質には、例えば、ヒトおよびマウス「584」タンパク質に対応する他の生物由来のホモログタンパク質や、ヒトおよびマウス「584」タンパク質の変異体が含まれる。本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が Frizzled ファミリータンパク質としての特性を有することを指す。Frizzled ファミリータンパク質としての構造的特性としては、1) N 末端にシグナル配列と考えられる配列を有する、2) 7 回膜貫通領域を持ち、N 末端領域は細胞外に、C 末端領域は細胞内に存在する、3) N 末側細胞外領域にシステインリッチドメイン (cystein rich domain; CRD) を持つ、4) 第 1 および第 2 細胞外領域ループに保存されたシステイン残基が存在する、5) C 末端 (細胞内) に PDZ 結合モチーフと考えられる配列を有する、といった特徴を有することが挙げられる。また、機能的特性としては、細胞外刺激に応答して細胞内へシグナルを伝達する受容体としての機能が挙げられる。例えば、Wnt タンパク質の受容体として、その下流のタンパク質 (例えば、Dvl や GSK-3 $\beta$  等) にシグナルを

伝達し、最終的に発生や分化を促す機能が考えられる。

あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) *Gene* 152, 271-275; Zoller, M. J. and Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer, W. and Fritz, H. J. (1987) *Methods Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 488-492; Kunkel T. A. (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) 等を用いて、ヒトまたはマウス「584」タンパク質のアミノ酸に適宜変異を導入することにより、ヒトまたはマウス「584」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、ヒトまたはマウス「584」タンパク質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、ヒトまたはマウス「584」タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、100アミノ酸以内であり、好ましくは50アミノ酸以内であり、さらに好ましくは20アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内であると考えられる。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸およびアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。

あるアミノ酸配列に対する1または複数個のアミノ酸残基の欠失、付加および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666; Zoller, M. J. and Smith, M. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500; Wang, A. et al. (1984) Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6409-6413)。

ヒトまたはマウス「584」タンパク質のアミノ酸配列(配列番号: 4または2)に複数個のアミノ酸残基が付加されたタンパク質には、ヒトまたはマウス「584」タンパク質を含む融合タンパク質が含まれる。融合タンパク質は、ヒトまたはマウス「584」タンパク質と他のペプチドまたはタンパク質とが融合したものであり、このような融合タンパク質もまた本発明に含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明のヒトまたはマウス「584」タンパク質をコードするDNAと他のペプチドまたはタンパク質をコードするDNAとを、フレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドまたはタンパク質としては、特に限定されない。

本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al. (1988) BioTechnology 6, 1204-1210)、6個のHis(ヒスチジン)残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のタンパク質との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST(グルタチオン S-トランスフェラーゼ)、HA(インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP(マルトース結合タンパク質)等が挙げられる。

市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードする DNA を、本発明のタンパク質をコードする DNA と融合させ、これにより調製された融合 DNA を発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。

また、あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製するための、当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ヒトまたはマウス「584」タンパク質をコードする DNA 配列(配列番号: 3 または 1) もしくはその一部を基に、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA からヒトまたはマウス「584」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。このように、ヒトまたはマウス「584」タンパク質をコードする DNA もしくはその一部からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、ヒトまたはマウス「584」タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、ヒトおよびマウス以外の哺乳動物のホモログ(例えば、サル、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコの遺伝子がコードするタンパク質)が挙げられる。ヒトまたはマウス「584」タンパク質をコードする DNA と相同性の高い cDNA を動物から単離する場合、発生中期から後期の胚の組織、例えば胎児期の脳、心臓、小腸、筋肉、肺および腎臓、または成体の小腸、肺、前立腺、子宮および胎盤等の組織を用いることが好ましいと考えられる。

ヒトまたはマウス「584」タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば 42°C、2×SSC、0.1%SDS の条件であり、好ましくは 50°C、2×SSC、0.1%SDS の条件である。より好ましいハイブリダイゼ

ーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件としては、例えば 50°C、0.1×SSC、0.1% SDS の条件である。このように、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度等、複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

また、ハイブリダイゼーションにかえて、ヒトまたはマウス「584」タンパク質をコードする DNA（配列番号：3または1）の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を利用して単離することも可能である。

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により単離される DNA がコードする、ヒトまたはマウス「584」タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、ヒトまたはマウス「584」タンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明のタンパク質には、ヒトまたはマウス「584」タンパク質と機能的に同等であり、かつ配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列と高い相同性を有するタンパク質も含まれる。高い相同性とは、通常、70%以上の同一性、好ましくは 80%以上の同一性、さらに好ましくは 90%以上の同一性を指す。タンパク質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726-730）に記載のアルゴリズムに従えばよい。

本発明のタンパク質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点または糖鎖の有無や形態等が異なり得る。しかしながら、得られたタンパク質は、本発明のヒトまたはマウス「584」タンパク質（配列番号：4または2）と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明のタンパク質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来のタンパク質のアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が付加される。また、真核細胞、例えば哺乳動物細胞で発現させた場合、N 末端のシグナル配列は除去

される。本発明のタンパク質はこのようなタンパク質も包含する。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、本発明のタンパク質をコードする DNA（例えば配列番号：1または3に記載の塩基配列を有する DNA）を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過等のクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

また、本発明のタンパク質をグルタチオン S-トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌等）内で発現させた場合には、発現させた組み換えタンパク質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。

融合タンパク質の精製後、必要に応じて融合タンパク質のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンピンまたはファクターXa 等により切断し、除去することも可能である。

天然のタンパク質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明のタンパク質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述する「584」タンパク質に結合する抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列からなる部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配

列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質の促進剤や阻害剤のスクリーニングに利用し得る。また、本発明のタンパク質のリガンドに対するアンタゴニストになり得る。本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：2または4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の機能ドメインからなる部分ペプチドが挙げられる。このような機能ドメインとしては、例えばシステインリッチドメインが挙げられる。また、疎水性プロット解析から推定される疎水性領域や親水性領域の1つあるいは複数の領域を含む部分ペプチドが挙げられる。これらの部分ペプチドは1つの疎水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよいし、1つの親水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよい。また、例えば、本発明のタンパク質の可溶型タンパク質や細胞外領域からなるタンパク質および細胞内領域からなるタンパク質も本発明に包含される。

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

本発明のタンパク質をコードするDNAは、上述したような本発明のタンパク質の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患や本発明のタンパク質により治療可能な疾患の遺伝子治療等への応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNA から合成された cDNA であるか、ゲノム DNA であるか、化学合成 DNA であるか等を問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、



本発明のタンパク質を発現している細胞より cDNA ライブラリーを作製し、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1 または 3）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNA ライブラリーは、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の方法により調製してもよいし、市販のライブラリーを用いてもよい。また、本発明のタンパク質を発現している細胞より RNA を調製し、逆転写酵素によって cDNA にした後、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1 または 3）に基づいてオリゴ DNA を合成し、これをプライマーとして用いて PCR 反応を行い、本発明のタンパク質をコードする cDNA を増幅させることにより調製することも可能である。

また、得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られた cDNA をプローブとしてゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノム DNA を単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器（例えば中期から後期の胚の組織、例えば胎児期の脳、心臓、小腸、筋肉、肺および腎臓、または成体の小腸、肺、前立腺、子宮および胎盤等の組織）から、mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al. (1979) Biochemistry 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159) 等により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全 RNA から mRNA を精製することにより行うことができる。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用

いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932) に従い、cDNA の合成および増幅を行うことができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を調製し、ベクターDNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とする DNA の塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

また、本発明の DNA においては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる (Grantham, R. et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 43-74)。また、本発明の DNA は、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当な DNA フラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) および/または終止コドン (TAA、TGA、または TAG) の挿入等が挙げられる。

本発明の DNA は、具体的には、配列番号：1 の塩基配列において 338 位の塩基 A から 2083 位の塩基 G からなる DNA、および配列番号：3 の塩基配列において 486 位の塩基 A から 2228 位の塩基 G からなる DNA を包含する。

本発明の DNA はまた、配列番号：1 または 3 に示す塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であり、且つ上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を含む。

ハイブリダイゼーションにおけるストリンジントな条件は、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジントな条件が挙げられる。

低ストリンジェントの条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば 42°C、2×SSC、0.1%SDS の条件であり、好ましくは 50°C、2×SSC、0.1%SDS の条件である。またハイブリダイゼーションにおける条件としては、より好ましくは、高ストリンジェントな条件である。高ストリンジェントな条件とは、例えば 50°C、0.1×SSC、0.1%SDS である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることができる。上記のハイブリダイズする DNA は、好ましくは天然由来の DNA、例えば cDNA または染色体 DNA である。

本発明は、また、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明の DNA を保持したり、本発明のタンパク質を発現させるために有用である。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blue）等で大量に増幅させて大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」を持ち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等が挙げられる。また、cDNA のサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7 等が挙げられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blue 等の大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZ プロモーター (Ward, E. S. et al. (1989) Nature 341, 544-546; Ward, E. S. (1992) FASEB J. 6, 2422-2427)、araB プロモーター (Better, M. et al. (1988) Science 240, 1041-1043)、または T7 プロモーター等を持っているこ

とが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1 (Pharmacia 社製)、「QIAexpress system」(Qiagen 社製)、pEGFP、または pET (この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい) 等が挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al (1987) J. Bacteriol. 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外においても、例えば、本発明のタンパク質を製造するためのベクターとして、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (Invitrogen 社製)や、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systems」(GIBCO BRL 社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えば pMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」(Invitrogen 社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40 プロモーター (Mulligan, R. C. et al. (1979) Nature 277, 108-114)、MMLV-LTR プロモーター、EF1 $\alpha$  プロモーター (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 5322)、CMV プロモーター等を持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418 等) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13

- 20 -

等が挙げられる。

さらに、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅させ、遺伝子を安定的に発現させるには、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクター（例えば、pCHO1 等）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて SV40 の複製起点を持つベクター（pcD 等）で形質転換する方法が挙げられる。複製起点としてはまた、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシバピローマウイルス（BPV）等に由来するものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明の DNA を発現させる方法としては、本発明の DNA を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウイルス法等により生体内に導入する方法が挙げられる。これにより、本発明の「584」遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター（例えば pAdexlcw）やレトロウイルスベクター（例えば pZIPneo）等が挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明の DNA の挿入等の一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である（Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning 2nd ed., 5.61-5.63, Cold Spring Harbor Lab. press）。生体内への投与は、ex vivo 法であっても、in vivo 法であってもよい。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞等を用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明

のタンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitro および in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al. (1981) Nature 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に、DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Kao, F. T. and Puck, T. T. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1275-1281) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリポソーム DOTAP (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクション等の方法で行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

- 2 2 -

これらの細胞を、目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6~8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30~40℃ で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* でタンパク質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物または植物に目的とする DNA を導入し、動物または植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳動物、または昆虫を用いる産生系がある。哺乳動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とする DNA を、ヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K. M. et al. (1994) Bio/Technology 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードする DNA を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のタンパク質を得ることがで

きる (Susumu, M. et al. (1985) Nature 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするタンパク質をコードする DNA を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Ma, J. K. et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24, 131-138)。

これにより得られた本発明のタンパク質は、宿主細胞内または細胞外 (培地等) から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用いて高度に精製されたタンパク質も包含する。

なお、タンパク質の精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシ



ルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ等が用いられる。

本発明は、また、本発明のタンパク質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギ等の免疫動物に本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが、哺乳動物、例えばヒト、マウスまたはラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列またはアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質であってもよいし、また、タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とはタンパク質の全長または断片に反応する抗体を意味する。

本発明のタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターにより本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的のタンパク質またはその断片を公知の方法で得て、これら有感作抗原として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞またはその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質有感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用され

る。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法に従って行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射する。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21 日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇することを常法により確認する。

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテイン A あるいはプロテイン G カラムを利用して精製することにより、免疫グロブリン G あるいは M を調製することができる。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別

のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre, G. and Milstein, C. (1981) *Methods Enzymol.* 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば EB ウィルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* でタンパク質、タンパク質発現細胞またはその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭 63-17688 号公報）。

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のタンパク質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型化抗体が好ましい。

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗

- 27 -

原となるタンパク質、タンパク質発現細胞またはその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて目的のタンパク質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号 W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735 および W096-34096 参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードする DNA をハイブリドーマまたは抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってもよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv または H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv) (Huston, J. S. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシン等で処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al. (1994) J. Immunol. 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H. (1989) Methods Enzymol. 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A. (1989) Methods Enzymol. 178, 497-515; Lamoyi, E. (1986) Methods Enzymol. 121, 652-663; Rousseaux, J. et al. (1986) Methods Enzymol. 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W. (1991) Trends Biotechnol. 9, 132-137 参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体または非ヒト抗体由来の CDR (相補性決定領域) とヒト抗体由来の FR (フレームワーク領域) および定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で正在されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定または酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。こ

これらのクロマトグラフィーは HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISA を用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニル磷酸等の酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質として、タンパク質の断片、例えばその C 末端からなる断片あるいは N 末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore (Pharmacia 製) を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体を検出または測定することからなる、本発明のタンパク質の検出または測定方法を実施することができる。本発明のタンパク質の検出または測定方法は、タンパク質を特異的に検出または測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

本発明はまた、ヒトまたはマウス「584」タンパク質をコードする DNA (配列番号: 3 または 1) またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

ここで「相補鎖」とは、G:C、A:T (または U) の塩基対からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少

- 30 -

なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このようなポリヌクレオチドには、本発明のタンパク質をコードする DNA の検出や増幅に用いるプローブやプライマー、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。また、このようなポリヌクレオチドは、DNA チップの作製に利用することもできる。本発明のポリヌクレオチドには、DNA および RNA が含まれる。また、センスヌクレオチドおよびアンチセンスヌクレオチドが含まれる。

プライマーとして用いる場合、3' 側の領域を相補的にして、5' 側には制限酵素認識配列やタグ等を付加することができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1 または 3 の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1 または 3 の塩基配列中の連続する少なくとも 15 個のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも 15 個のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型またはエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体またはホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA または mRNA の所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみならず、DNA または mRNA とオリゴヌクレオチドとが配列番号：1 または 3 に示される塩基配列

に特異的にハイブリダイズできる限り、1 または複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のタンパク質の産生細胞に作用して、該タンパク質をコードする DNA または mRNA に結合することにより、その転写または翻訳を阻害したり、mRNA の分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤等、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法に従って調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、または血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リボソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチンまたはこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは0.1~50mg/kg の範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明のタンパク質の発現を阻害し、従って本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

本発明のタンパク質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。



すなわち、本発明のタンパク質と、該タンパク質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明のタンパク質に結合する活性を有する化合物を選択することからなる、本発明のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

スクリーニングに用いられる本発明のタンパク質は組換えタンパク質であっても、天然由来のタンパク質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被験試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被験試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、可溶性タンパク質として、担体に結合させた形態として、他のタンパク質との融合タンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、また、膜画分として被験試料に接触させることができる。

本発明のタンパク質を用いて、例えば該タンパク質に結合するタンパク質（リガンド等）をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8 等の外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞等で当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141 (1982)), EF-1  $\alpha$  promoter (Kim, D. M. et al. (1990) Gene 91, 217-223)、CAG promoter (Niwa, H. et al. (1991) Gene 108, 193-200)、RSV LTR promoter (Cullen, B. R. (1987) Methods in Enzymology 152, 684-704)、SR $\alpha$  promoter (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 466-472)、CMV immediate early promoter (Seed, B. and Aruffo,

- 3 3 -

A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365-3369)、SV40 late promoter (Gheysen, D. and Fiers, W. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 385-394)、Adenovirus late promoter (Kaufman, R. J. et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 946-958)、HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15, 1311-1326)、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752)、DEAE デキストラン法 (Lopata, M. A. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 5707-5717; Sussman, D. J. and Milman, G. (1985) Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643)、リポフェクチン法 (Derijard, B. (1994) Cell 7, 1025-1037; Lamb, B. T. et al. (1993) Nature Genetics 5, 22-30; Rabindran, S. K. et al. (1993) Science 259, 230-234) 等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位 (エピトープ) を本発明のタンパク質の N 末または C 末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合タンパク質として本発明のタンパク質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる (実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 等との融合タンパク質を発現することができるベクターが市販されている。

融合タンパク質にすることにより本発明のタンパク質の性質をできるだけ変化させないようにするために、数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合タンパク質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン (His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒト c-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウィルス糖タンパク質 (VSV-GP)、T7 gene10 タンパク質 (T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウィルス糖タンパク質 (HSV-tag)、E-tag (モノク

ローナルファージ上のエピトープ) 等のエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる(実験医学 13, 85-90 (1995))。

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のタンパク質、それと結合能を有するタンパク質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のタンパク質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のタンパク質に対する抗体は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたタンパク質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリ等に免疫することで調製することができる。また、合成した本発明のタンパク質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、GST 等のエピトープとの融合タンパク質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4B 等のこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のタンパク質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

免疫沈降されたタンパク質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることで、結合していたタンパク質をタンパク質の分子量により解析することができる。また、この際、一般的には本発明のタンパク質に結合したタンパク質は、クマシー染色や銀染色といったタンパク質の通常の染色法では検出

することは困難であるので、放射性同位元素である  $^{35}\text{S}$ -メチオニンや  $^{35}\text{S}$ -システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のタンパク質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。タンパク質の分子量が判明すれば直接 SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。

また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に結合するタンパク質を単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al. (1991) Cell 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、本発明のタンパク質と結合する結合タンパク質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器 (例えば胎児期の脳、心臓、小腸、筋肉、肺および腎臓、または成体の小腸、肺、前立腺、子宮および胎盤等の組織や培養細胞等) よりファージベクター ( $\lambda\text{gt}11$ , ZAP 等) を用いた cDNA ライブラリーを作製し、これを LB-アガロース上で発現させ、フィルターに発現させたタンパク質を固定し、精製して標識した本発明のタンパク質と上記フィルターとを反応させ、本発明のタンパク質と結合したタンパク質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明のタンパク質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のタンパク質または本発明のタンパク質に融合したペプチドまたはポリペプチド (例えば GST 等) に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法または蛍光を利用する方法等が挙げられる。

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R. (1994) Trends Genet. 10, 286-292; Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element, Cell 68, 597-612, 「MATCHMAKER Two-Hybrid System」、 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」、 「MATCHMAKER One-Hybrid System」 (いずれも Clontech 社製); 「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」 (Stratagene 社製)) を用いて行う方法

- 36 -

が挙げられる。2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを SRF DNA 結合領域または GAL4 DNA 結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16 または GAL4 転写活性化領域と融合する形で発現するような cDNA ライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来 cDNA を単離する(酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)。単離した cDNA を大腸菌に導入して発現させることにより、該 cDNA がコードするタンパク質を得ることができる。これにより本発明のタンパク質に結合するタンパク質またはその遺伝子を調製することが可能である。2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3 遺伝子の他、Ade2 遺伝子、LacZ 遺伝子、CAT 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のタンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のタンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のタンパク質に結合したタンパク質を調製することができる。

得られたタンパク質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴ DNA を合成し、該 DNA をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードする DNA を得ることができる。

本発明において、結合した化合物を検出または測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモ

ン共鳴現象を利用したバイオセンサーは本発明のタンパク質と被検化合物との間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えば BIAcore、Pharmacia 製）。従って、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることにより本発明のタンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

また、タンパク質に限らず、本発明のタンパク質に結合する化合物（アゴニスト、およびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton, N. C. et al. (1996) Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science 273, 458-64; Verdine, G. L. (1996) The combinatorial chemistry of nature, Nature 384, 11-13; Hogan, J. C. Jr. (1996) Directed combinatorial chemistry, Nature 384, 17-19）が当業者に公知である。

本発明のタンパク質に結合する化合物は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明のタンパク質の発現異常や機能異常等に起因する疾患や本発明のタンパク質の活性を制御することにより治療可能な疾患の治療への応用が考えられる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明のタンパク質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失および／または置換により変換される物質も、本発明のタンパク質に結合する化合物に含まれる。

また、本発明の「584」遺伝子を利用して、生体内または細胞内においてこれら遺伝子の発現（転写および翻訳を含む）を調節しうる化合物をスクリーニングすることも考えられる。このスクリーニングは、例えば、癌の治療薬や予防薬の候補化合物のスクリーニングとして利用しうる。本発明において、いくつかの癌細

胞株において本発明の「584」遺伝子が高発現していることが判明したことから、「584」遺伝子の発現を抑制する化合物は、抗癌剤としての効果を期待し得る。また、「584」遺伝子の発現を上昇させる化合物は、臓器再生等での利用なども考えられる。またこれらの化合物は、腫瘍細胞モデルの作製や腫瘍の病態解析に有用である。

このスクリーニングは、(a)本発明の DNA を内因的に発現する細胞に被検試料を接触させる工程、(b) 該発現を検出する工程、および (c) 被検試料を該細胞に接触させない場合 (対照) と比較して、該発現を促進または阻害する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法により実施しうる。ここで DNA の発現には、転写および翻訳が含まれる。

例えば、本発明の「584」遺伝子を発現している細胞を被検試料と共に培養し、該遺伝子の発現 (転写および翻訳を含む) をノーザン解析や RT-PCR 法などの mRNA を検出する方法、あるいはウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA などの蛋白質を検出する方法、またはこれらを改良した方法により検出し、被検試料を添加しない場合と比較して、該遺伝子の発現を促進あるいは阻害する化合物を選択することにより、目的の化合物スクリーニングすることができる。

スクリーニングに用いる細胞に特に制限はないが、発現を低下させる化合物のスクリーニングにおいては、「584」遺伝子の発現上昇が見られる種々の癌細胞株が挙げられる。このような癌細胞株としては、例えば子宮頸癌細胞株が挙げられ、具体的には ME180、SKG IIIa、HeLa および HeLa S3 が例示できる。また、前立腺癌細胞株 (例えば LNCap)、卵巣癌細胞株 (例えば PA1)、平滑筋肉腫 (例えば LMSU-7, 14) などとも利用し得る。逆に発現を上昇させる化合物のスクリーニングを目的とした場合は、「584」遺伝子の発現レベルが低い細胞を用いることができる。このような癌細胞株としては、例えば HL60、K562、MOLT-4、Raji、SW480、A549、G361、PC3、DU145、OVK18 等が挙げられる。

ノーザン解析や RT-PCR などの mRNA を検出する方法においては、例えば配列番

号：1または3に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドをプローブまたはプライマーとして利用することができる。また、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA などの蛋白質を検出する方法においては、本発明の抗体を利用することができる。

これらスクリーニングにより単離された、本発明の「584」遺伝子の発現を調節する化合物は、該遺伝子の発現異常を伴う種々の疾患に対する医薬品の候補となる。特に、癌などの疾患を予防または治療する薬剤としての利用が期待される。本発明のスクリーニング方法を用いて単離する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニングにより単離し得る化合物に含まれる。

本発明のタンパク質に結合する化合物、本発明の DNA の発現を調節する化合物、あるいは本発明のタンパク質およびその部分ペプチドをヒトや哺乳動物等、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、タンパク質や単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロ



- 40 -

ースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法等により変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状等により変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

本発明のタンパク質の投与量は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人(体重 60kg として)においては、1 日あたり約 100 $\mu$ g から 10~20mg であると考えられる。

本発明のタンパク質と結合する化合物、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物、あるいは本発明の DNA の発現を調節する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.1 から 100mg、好ましくは約 1.0 から 50mg、より好ましくは約 1.0 から 20mg である。

非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.01 から 30mg、好ましくは約 0.1 から 20mg、より好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量、あるいは体表面積当たりに換算した量を投与することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、「m584」の cDNA 配列および予想アミノ酸配列を示す図である。下線部分の領域をノーザンプロットのプロープとして用いた。

図 2 は、「h584」および「m584」の親水性・疎水性プロットである。シグナル配列と思われる部分を斜線で、システインリッチドメイン（CRD）部分を破線で、膜貫通領域と思われる部分を灰色で示す。

図 3 は、「m584」とマウス既知 Frizzled ファミリー（Frizzled-3, 4, 7, 8 および 9）とのアミノ酸配列比較を示す図である。CRD のシステイン残基を一重下線で、第 2 および第 4 ループの保存されたシステイン残基を二重下線で、7 回膜貫通領域を波下線で示す。また C 末端 PDZ 結合配列を陰付きで示す。

図 4 は、CL6 分化誘導系における「m584」の発現を示す写真である。

図 5 は、ノーザンプロットによる「m584」の発現組織分布を示す写真である。使用したプロープの領域は図 1 参照のこと。

図 6 は、「h584」の cDNA 配列および予想アミノ酸配列を示す図である。

- 4 2 -

図7は、図6の続きである。下線部分の領域をノーザンプロットのプロープとして用いた。

図8は、「m584」と「h584」のアミノ酸配列の比較を示す図である。CRDのシステイン残基を一重下線で、第2および第4ループの保存されたシステイン残基を二重下線で、7回膜貫通領域を波下線で示す。またC末端PDZ結合配列を陰付きで示す。

図9は、ノーザンプロットによる「h584」の発現組織分布を示す写真である。使用したプロープの領域については図7参照のこと。胎児皮膚で観察されるシグナルはノイズである。

図10は、RT-PCRによる生殖関連組織癌細胞株における「h584」の発現を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### [実施例1] m584 遺伝子断片の単離

CL6細胞は、マウス胚性腫瘍細胞株P19より羽原-大久保によって単離された未分化な細胞である(Habara-Ohkubo, A. (1996) Cell Struct. Funct. 21, 101-10)。この細胞は、付着性細胞培養条件下1% DMSOの刺激を加えることにより、未分化な形質を失い心筋様細胞へと分化する。これまでに心筋の分化や、発生における心臓形成に関与する遺伝子は数多く知られているが、まだ鍵となる遺伝子は見いだされていない。そこで心筋分化に関連する遺伝子を探索するために、未分化なCL6細胞と、CL6培養系に1% DMSOを加えてから4日後の細胞のpolyA<sup>+</sup> RNAを用いて、サブトラクション法で心筋分化誘導直後に発現の上昇する遺伝子断片の単離を試みた。

CL6細胞の培養は、羽原-大久保の方法(上記)によって行った。DMSO未添加あ

- 43 -

るいは 1% DMSO 添加後 4 日目の細胞をトリブシン消化し、細胞を集め RNeasy total RNA isolation kit (QIAGEN) で全 RNA (total RNA) を得た。全 RNA より Mini-Oligo(dT) Spin Column Kit (5prime-3prime, Inc.) を用いて polyA<sup>+</sup> RNA を得た。

このようにして得られた DMSO 未添加あるいは 1% DMSO 添加後 4 日目の CL6 細胞由来の polyA<sup>+</sup> RNA を用いて、1% DMSO 添加後 4 日目マイナス DMSO 未添加のサブトラクションを CLONTECH PCR select cDNA Subtraction Kit (CLONTECH 社) でキット添付の方法で行った。得られた subtracted PCR 産物は Zero blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen 社) を用いて pCR Blunt II vector にサブクローニングした。組み換え体を持つコロニーはコロニーPCR で増幅した。

コロニーPCR は、SPORT FW (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' / 配列番号: 5)、SPORT RV (5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3' / 配列番号: 6) および KOD dash ポリメラーゼを含む 20  $\mu$ l の PCR 反応溶液に組み換え体を持つコロニーを直接懸濁し、「94°C, 1 分 → (96°C, 15 秒 → 55°C, 5 秒 → 72°C, 25 秒) × 32 サイクル」の条件で行った。

増幅された PCR 生成物はアガロースゲル電気泳動で確認し、必要に応じて PCR 生成物を Microspin S-300、S-400 ゲルろ過 (Pharmacia 社) で精製した。これをシーケンス反応のテンプレートとして用い、塩基配列を確認した。シーケンス反応では、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit (Perkin-Elmer 社) を用いたサイクルシーケンシングを行った。プライマーには nested primer1 (nP1) および nested primer 2R (nP2R) (CLONTECH 社) を用いた。未反応のプライマーおよびヌクレオチド等を 96 well precipitation HL kit (AGTC) で除去し、ABI 377 あるいは ABI 377XL DNA Sequencer (Perkin-Elmer 社) で塩基配列を決定した。

単離された多数の遺伝子断片の塩基配列を解析した結果、その中の 1 つ、PS40-584 は、BLAST によるデータベース検索により、一部の領域で既知の frizzled

- 4 4 -

ファミリー遺伝子と高い相同性を示すことが判明した。しかし、この遺伝子断片の全領域において高い相同性を示す既知遺伝子は存在せず、新規 frizzled ファミリー遺伝子の断片であることが判明した。

【実施例 2】 m584 遺伝子の cDNA クローニング

CL6 培養系に 1% DMSO を加えてから 4 日後の polyA<sup>+</sup> RNA を用いて作成した Marathon cDNA や、マウス 10.5 日胚 cDNA プラスミドライブラリーをテンプレートとして、遺伝子断片である PS40-584 の塩基配列を元に、マウス 584 遺伝子 (m584) の全 ORF を含む cDNA を以下のようにクローニングした。

1% DMSO 刺激後 4 日目の CL6 細胞より polyA<sup>+</sup> RNA を単離し、これを原料として Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社) を用いてキットのマニュアル通りに Marathon cDNA (CL6 DMSO 4d Marathon cDNA) を作成した。

Subtracted clone PS40-584 の塩基配列を基にプライマー、584-A (5' ATG AAC AAT CAG ACC AAG ACA CCT 3' / 配列番号 : 7)、584-B (5' TTC ATA CTT CCC AAG GTG AGG TT 3' / 配列番号 : 8)、584-C (5' TCA CCA GTG CAG GGA TCT ACA AA 3' / 配列番号 : 9)、584-D (5' GCA GTC AGG TGT CTT GGT CTG ATT 3' / 配列番号 : 10) をベックマン DNA 自動合成機で合成した。

テンプレートとして CL6 DMSO 4d Marathon cDNA を、プライマーとして、584-A と AP1 (一次 3' RACE)、次いで、584-C と AP2 (nested 3' RACE) および 584-B と AP1 (一次 5' RACE)、次いで、584-D と AP2 (nested 5' RACE) を用い、ポリメラーゼとして Advantage cDNA polymerase を用いて RACE を行った。

RACE は、一次 RACE の場合は、「95℃, 1 分→(96℃, 15 秒→63℃, 15 秒→68℃, 3 分) × 30 サイクル」の条件で、nested RACE の場合はこれと同じ条件で 15 サイクルの条件で行った。

Nested RACE 産物は、rTaq (TaKaRa 社) で dA を付加した後、pCR 2.1 TOP0 (Invitrogen 社) にサブクローニングし、その塩基配列を決定した。

5' RACE 産物の塩基配列を基に、584-J (5' CGA ACA CAG GAA GAA GCG AAG GTG

- 4 5 -

3' / 配列番号 : 1 1)、584-N (5' GTT CTC GTG ACC CAT CAG GTT GG 3' / 配列番号 : 1 2) のプライマーを合成した。SuperScript マウス 10.5 日胚 cDNA ライブラリー (GIBCO BRL 社) を  $2.1 \times 10^3$  クローンとなるように 5 ml LB-Amp 培地に加え、30°C で培養したのち QIAspin mini prep kit (QIAGEN 社) でプラスミドを得た。このプラスミドをテンプレートとし、プライマーとして 584-J および SPORT RV (1st. 5' RACE)、次いで、584-N および SPORT SP6 (5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG A 3' / 配列番号 : 1 3) を用い、PCR を PCR system-Platinum Taq (GIBCO BRL 社) で行った。その結果、m584 の全 ORF を含む cDNA をクローニングすることに成功した (図 1)。

クローニングできた全 ORF を含む m584 の cDNA は 2621 塩基で、582 アミノ酸をコードしていた (m584 の cDNA 配列を配列番号 : 1 に、アミノ酸配列を配列番号 : 2 に示す)。このアミノ酸配列は、既知の frizzled ファミリー遺伝子と同様に、①N 末端にシグナルシーケンスと思われる配列を有する、②7 回膜貫通領域を持つ、③N 末側領域に CRD を持つ、④第 2 および第 4 ループに保存されたシステイン残基が存在する、⑤C 末端に PDZ 結合モチーフと思われる配列を有する、という構造上の特徴を持つ (図 1、2)。

m584 の cDNA について BLAST によるデータベースサーチを行った結果、マウス 15.5 日胚 EST (AA103796) と完全一致したが、これ以外には完全一致のクローンはなかった。また既知の frizzled 遺伝子と一部の領域で高い相同性を示した。また、m584 のアミノ酸配列をデータベース検索したところ、既知の frizzled 遺伝子と一部の領域 (N 末端から 7 回膜貫通領域) で高い相同性を示したが、全領域で高い相同性を有する既知の遺伝子は存在せず、m584 が新規 frizzled ファミリー遺伝子であることがわかった (図 3)。

#### [実施例 3] CL6 分化誘導系での m584 遺伝子の発現

CL6 は未分化な胚性腫瘍細胞株 P19 より単離された細胞株であり、DMSO の刺激を加えることで約 10 日間かけて未分化な形質より心筋様細胞へと分化する。m584

は、CL6 の心筋分化誘導直後 (DMSO 刺激後 4 日目) に発現の上昇する遺伝子として得られたものである。そこで未分化な CL6 (DMSO 刺激なし)、DMSO の刺激を加えてから 4 日目、8 日目および 12 日目の CL6 より RNA を単離し、RT-PCR によって CL6 分化誘導系における m584 遺伝子の発現を解析した。このとき、成体マウス心臓より単離した RNA も同時に解析に供した。

DMSO 未添加あるいは 1% DMSO 添加後 4 日目、8 日目および 12 日目の CL6 細胞より調製した全 RNA (total RNA) と、C3H/He マウス心臓全 RNA (ニッポンジーン社) を SuperScript II (GIBCO BRL 社) を逆転写酵素として用い、(dT)<sub>30</sub> VN プライマーを用いて cDNA を合成し、RT-PCR のテンプレートとした。584-A と 584-B のプライマーセットと、コントロールとして G3PDH 5' (5' GAG ATT GTT GCC ATC AAC GAC C 3' / 配列番号: 14) と G3PDH 3' (5' GTT GAA GTC GCA GGA GAC AAC C 3' / 配列番号: 15) のプライマーセットを用い、Advantage cDNA polymerase を使用した RT-PCR を「95°C, 1 分→(96°C, 15 秒→60°C, 15 秒→68°C, 30 秒) × 29 サイクル (G3PDH の時は 20 サイクル)」の条件で行った。

その結果、m584 は未分化な CL6 においても多少発現していることが判明した (図 4)。また、m584 の発現は DMSO の刺激を加えることにより一過的に上昇し (刺激後 4 日目)、分化が進行するにつれて次第に低下していくことが判明した。ほとんど心筋様細胞へと分化してしまっている DMSO 刺激後 12 日目では、m584 はほとんど発現しておらず、成体マウス心臓においてはその発現は全く認められなかった。このことより m584 は心筋分化、または心臓の形成に関与する遺伝子であることが示唆された。

#### [実施例 4] m584 遺伝子の発現組織分布

次に、既知 frizzled ファミリー遺伝子と相同性の低い領域をプローブとして、ノーザンブロットにより m584 の発現組織を解析した。

サブトラクションで得られた PS40-584 をテンプレートとし、nP1 と nP2R で PCR を行い、約 1Kb の産物を得た。この PCR 産物を Megaprime DNA labelling system

- 47 -

(Amersherm 社) を使用し  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  でラベリングし、未反応の  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  を除去したものを m584 プローブとした。Mouse Multiple Tissue Northern (MTN) blot および Mouse Embryo MTN blot (CLONTECH) を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH 社) 中で、添付マニュアルの方法に従い、68°C でハイブリダイゼーションを行った。増感スクリーンを用い -80°C で 5 日間感光を行った。

その結果、11 日目胚、15 日目胚、17 日目胚で約 3.5Kb のバンドが確認できた。これらのステージの中では 11 日目胚での発現がもっとも強い。他方 7 日目胚や、心臓を含め成体ではこのバンドは確認できなかった (図 5)。上述の CL6 分化誘導系での発現パターンと考え併せると、m584 は発生の初期段階というよりは、中期から後期、特に中期の発生に関与しているものと思われる。

#### [実施例 5] h584 遺伝子の cDNA クローニング

m584 の塩基配列を基にヒト 584 遺伝子 (h584) のクローニングを行った。m584 の塩基配列よりプライマーを合成し、ヒト精巣 cDNA ライブラリーをテンプレートに低ストリンジェンシー PCR によって以下のように h584 の遺伝子断片を得た。

まず、SuperScript Human testis cDNA library (GIBCO BRL 社) を  $3.8 \times 10^5$  クローンとなるように LB-Amp 培地に加え、30°C で培養したのち QIASpin mini prep kit (QIAGEN 社) でプラスミドを得た。これをテンプレートとし、m584 の塩基配列を基に合成したプライマー、584-K (5' GGC GCG GAG AGC ATC GCN TG 3' / 配列番号: 16) と 584-L (5' ACA TCC ATG CTG CCC ACA TAR CA 3' / 配列番号: 17) を用い、Advantage cDNA polymerase を使用して PCR を行った。PCR は、「95°C, 1 分 → (96°C, 15 秒 → 56°C, 15 秒 → 68°C, 1 分) × 32 サイクル」の条件で行った。

約 0.3Kb の PCR 産物をアガロースゲルから切り出し、その塩基配列を上記と同様に決定した。この塩基配列を利用し、Human testis cDNA library および human fetal kidney Marathon ready cDNA をテンプレートとし、3' および 5' RACE を以下のように実施した。

まず得られた h584 の遺伝子断片の塩基配列よりプライマー、h584-A (5' CGA CCG



GGA CAG CGG CCA 3' / 配列番号 : 18)、h584-B (5' CCG CCA CCC TGC GCA TGA C 3' / 配列番号 : 19)、h584-C (5' GGT GAA GAC CAT CCT GAT CCT GGT 3' / 配列番号 : 20)、h584-D (5' GAT GAC ATA GAG CTG GCC GCT G 3' / 配列番号 : 21) を合成した。

次に、SuperScript Human testis cDNA library (GIBCO BRL 社) を  $1.6 \times 10^4$  クローンとなるように LB-Amp 培地に加え、30°C で培養したのち QIAspin mini prep kit (QIAGEN 社) でプラスミドを得た。このプラスミドをテンプレートとし、プライマーとして h584-A と SPORT T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' / 配列番号 : 22) (一次 3' RACE)、次いで、h584-C と SPORT T7 (nested 3' RACE)、および h584-B と SPORT SP6 (一次 5' RACE)、次いで h584-D と SPORT SP6 (nested 5' RACE) を用いて、ポリメラーゼとして Advantage cDNA polymerase を用い以下のサイクルでプラスミド cDNA ライブラリー-RACE を行った。

一次 RACE は、「95°C, 1 分 → (96°C, 15 秒 → 55°C, 15 秒 → 68°C, 2 分) × 30 サイクル」、nested RACE は 15 サイクルで行った。

5' nested RACE 産物はゲルろ過後、PCR で使用したプライマーで塩基配列を確認した。この塩基配列を基に 5' 一次 RACE 用プライマー h584-F (5' GCG CTC CAT GCA CAG GTA GTT G 3' / 配列番号 : 23) および 5' nested RACE 用プライマー h584-H (5' ATG GGC TGG CAT TTGCCG TCG C 3' / 配列番号 : 24) を作成し、human fetal kidney Marathon ready cDNA (CLONTECH 社) をテンプレートとし、PCR system - Platinum Taq をポリメラーゼとして 5' RACE を以下のサイクルで行った。

一次 RACE は、「95°C, 1 分 → (96°C, 15 秒 → 65°C, 15 秒 → 68°C, 1 分) × 30 サイクル」、nested RACE は上記 PCR を 30 サイクルで行った。

3' nested RACE 産物は rTaq (TaKaRa 社) で dA を付加した後、pCR II TOPO (Invitrogen 社) にサブクローニングし、Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (TaKaRa 社) を用い遺伝子欠失変異体 (deletion mutants) を作成し、その塩基配列を決定した。その結果、全 ORF を含む h584 cDNA をクローニングすることができた (図

6 および 7)。

h584 の cDNA は 3269 塩基で、581 アミノ酸をコードしている (m584 と比べて 1 アミノ酸短い)。h584 の cDNA 配列を配列番号：3 に、該 h584 cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4 に示す。m584 と比較すると、コーディング領域での核酸配列で 86.9%、アミノ酸配列で 92.8% の相同性を持つことが判明した (図 8)。h584 のアミノ酸配列も m584 や他の既知 frizzled ファミリー遺伝子と同様、①N 末端にシグナルシーケンスと思われる配列を有する、②7 回膜貫通領域を持つ、③N 末側領域に CRD を持つ、④第 2 および第 4 ループに保存されたシステイン残基が存在する、⑤C 末端に PDZ 結合モチーフと思われる配列を有する、という構造上の特徴を持つ (図 2、8)。m584 と比較した際に注目すべき点は、特に C 末端の PDZ 結合モチーフ (コンセンサス; Thr/Ser-Xaa-Leu/Ile/Val-COOH。ただし、このコンセンサスから外れている例も多い) は、m584 では Ala-Cys-Val-COOH であるのに対し、h584 では Thr-Cys-Val-COOH である。

h584 の cDNA を BLAST 検索にかけると、3' 非コード領域 (NCR) で 13 個のヒト EST が完全一致としてヒットした。そのうち肺カルシノイド (lung carcinoid) 由来のものが 2 つ (AI697875, AI697852)、卵巣腫瘍 (ovary tumor) 由来が 3 つ (AA581479, AA291368, AA478225)、成体脳 (adult brain) 由来が 4 つ (H46778, H46337, H19600, H19514)、胎児腎臓 (fetal kidney) 由来のものが 1 つ (AA340556) であった。しかし、コーディング領域にヒットする EST は無く、また既知の frizzled 遺伝子と一部の領域で高い相同性を示したものの、全領域で完全に一致するものはなかった。さらに h584 のアミノ酸配列をデータベース検索しても全領域で高い相同性を有する既知の遺伝子は存在せず、h584 が新規 frizzled ファミリー遺伝子であることが判明した。

#### [実施例 6] h584 遺伝子の発現組織分布

ヒト既知 frizzled ファミリー遺伝子と相同性の低い領域をプローブとして、ノーザンブロットにより h584 の発現組織を確認した。

- 50 -

まず SuperScript Human testis cDNA library (GIBCO BRL 社) を  $1.6 \times 10^4$  クローンとなるように LB-Amp 培地に加え、30°C で培養したのち QIAspin mini prep kit (QIAGEN 社) でプラスミドを得た。このプラスミドをテンプレートとし、h584-G (5' ACC AGA CTA AAA CGC TGG ACT G 3' / 配列番号: 25) と h584-J (5' CCA CAA ATT AGT TAC ACA AGA GGC 3' / 配列番号: 26) とをプライマーとし、Advantage cDNA polymerase を使用した PCR を「95°C, 1 分 → (96°C, 15 秒 → 63°C, 15 秒 → 68°C, 1 分) × 32 サイクル」の条件で行った。

この PCR 産物を Megaprime DNA labelling system (Amersherm 社) を使用し [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP でラベリングし、未反応の [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP を除去したものを h584 プローブとした。Human Multiple Tissue Northern (MTN) blot I, IV, Human Cancer Cell Line MTN blot (CLONTECH 社) および Northern Territory mRNA Act-N Human Fetal Tissue Blot I, II (Invitrogen 社) を用い、ExpressHyb Hybridization Solution 中で、添付マニュアルの方法に従い、68°C でハイブリダイゼーションを行った。イメージングプレートの感光を 5 日間行い、解析はイメージアナライザー BAS2000 (富士写真フイルム社) で行った。

その結果、ヒト成体組織では小腸、肺、前立腺、子宮および胎盤で発現が認められ、また低レベルではあるが脳と胸腺においても発現していることが判明した (図 9)。ヒト胎児では脳、心臓、小腸、筋肉、肺および腎臓で約 3.5Kb のバンドが確認された (図 9 における胎児皮膚で約 3.5kb のバンドが観察されるが、これはノイズである)。これらの中では成体胎盤における発現がもっとも強い。興味深いことに、8 種類のヒト癌細胞株の中では、子宮頸癌細胞株である HeLa S3 においてのみ、h584 は非常に高レベルで発現していることが判明した。

#### [実施例 7] 生殖関連組織のヒト癌細胞株における h584 の発現

上記のように、子宮頸癌細胞株である HeLa S3 において、h584 は非常に高いレベルで発現していた。また、正常成体においては前立腺、子宮および胎盤といった生殖関連組織で発現していた。そこで、生殖関連組織の癌細胞株 (前立腺癌細胞株)

- 51 -

胞株、卵巣癌細胞株、平滑筋肉腫細胞株および子宮頸癌細胞株)でのh584の発現の有無をRT-PCR法によって調べた。ヒト前立腺癌細胞株PC3、DU145およびLNCap、ヒト卵巣癌細胞株PA-1およびOVK-18、ヒト平滑筋肉腫細胞株LMSU-7およびLMSU-14、ヒト子宮頸癌細胞株ME180、CaSki、SKG IIIa、HeLa P3(S)、HeLaおよびHeLa S3よりtotal RNAを単離した。これを用いてAMV RTase (ニッポンジーン)と(dT)<sub>30</sub>VNプライマーでcDNAを合成し、RT-PCRのテンプレートとした。また、HeLa S3 cDNA (CLONTECH)もRT-PCRのテンプレートとした。h584-Jとh584-Cをプライマーとして用い、Advantage cDNA polymeraseを使ったPCRを「95°C, 1分→(96°C, 15秒→63°C, 15秒→68°C, 2分)×34サイクル」の条件で行った。

その結果、子宮頸癌細胞株ME180、SKG IIIa、HeLaおよびHeLa S3において、h584の発現が認められた(図10)。子宮頸癌細胞株HeLaのサブラインであるHeLa P3(S)ではh584の発現は観察できなかった。

次にME180、SKG IIIa、HeLaおよびHeLa S3でのh584の変異の有無を調べた。上記cDNAをテンプレートとし、h584-Jとh584-O(5' GCG AGG ACA CGT CCA ACG CCA 3' /配列番号: 27)をプライマーとして用いて36サイクルのPCRを行い、全長ORFを含む領域のRT-PCRを行い、cDNA塩基配列を決定した。その結果、核酸レベルでの変異は数ヶ所あることがわかったが、いずれもアミノ酸レベルでの変異は伴わず、これら細胞株で発現しているh584は正常な機能を持つことが示唆された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規Frizzledファミリータンパク質「584」および該タンパク質をコードする遺伝子が提供された。該遺伝子は胚発生に関与していると考えられることから、発生におけるマーカーや発生を制御するための因子として利用される。また、発生や器官形成に関わる新たな因子の精製やクローニング、さらには生体内の発現調節異常により本発明の遺伝子発現が異常となることにより起こる様々な疾病に対する医薬品開発のためのツールとして利用することが可能で

- 5 2 -

ある。また、本発明の「584」遺伝子は腫瘍形成にも関与していると考えられる。従って本発明のタンパク質を利用した腫瘍に対する医薬品開発が期待される。本発明の遺伝子をターゲットにした薬剤等を設計することにより、新たな作用機序による医薬品の開発が可能であると考えられる。

## 請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(b) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(c) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

2. 請求項 1 に記載の DNA によりコードされるタンパク質。

3. 請求項 1 に記載の DNA が挿入されたベクター。

4. 請求項 3 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

5. 請求項 4 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 2 に記載のタンパク質の製造方法。

6. 請求項 2 に記載のタンパク質の部分ペプチド。

7. 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

8. 請求項 2 に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する

工程、

(c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項2に記載のタンパク質に結合する化合物。

10. 抗体である、請求項9に記載の化合物。

11. 請求項8に記載の方法により単離されうる、請求項2に記載のタンパク質に結合する化合物。

12. 請求項1に記載のDNAの発現を調節する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該DNAを内因的に発現する細胞に被検試料を接触させる工程、

(b) 該発現を検出する工程、

(c) 被検試料を該細胞に接触させない場合と比較して、該発現を促進または阻害する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

13. 請求項12に記載の方法により単離されうる、請求項1に記載のDNAの発現を調節する化合物。

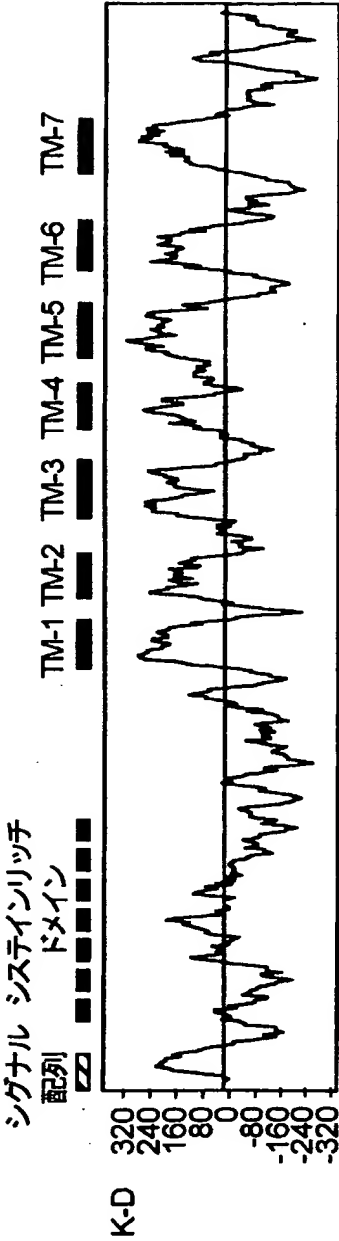
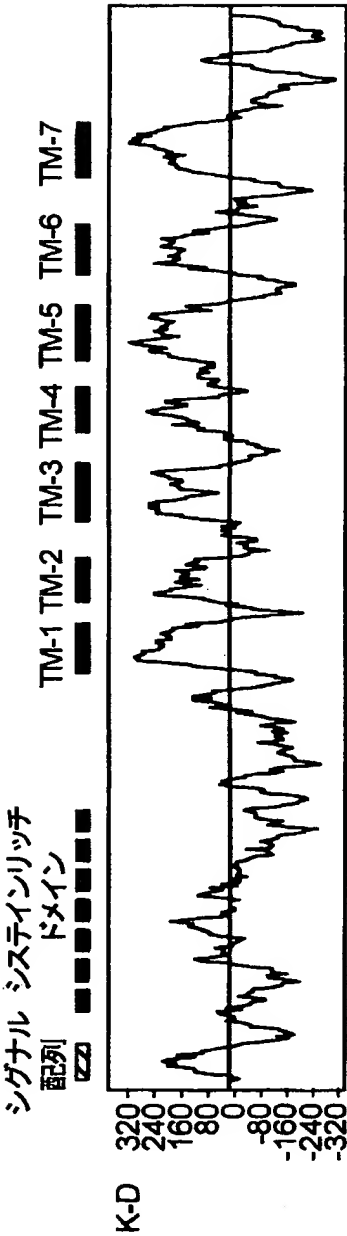
1 / 10

☒ 1

|   |      |
|---|------|
| CGGGCCGGTCGACCAGGGCTAGGGCCAGGTGTGCCCGGCTGCCCCACCGCGTCCGGATCGCCCGCGCCGGAAGAAGAGGCCAA       | 90   |
| AGTTTGC6CGCTGAGCGGCGCTCGCTCCGCGTATTGTTGCAAACTTCGCTCCCTCCCGCGCGCCCCGACTCCGCTGAGGCGCGG      | 180  |
| CGCCACCGCGGTGGCCCCGGGCGCCGAGCGCTCCGGCCAGACTGGATGGCATCGCGGGGGCCGAGCCGGGGCGGAGCCGCGG        | 270  |
| GCAGCAGCAACAGCCCGTGCCCGGAGCGGCGCCCTGAGCGGCGTGGGACATTGCGGGCGCCACCATGCAACACCCGGGCCCCGCGCT   | 360  |
| M Q H P G P R L   |      |
| GTGGCTGGTGTGCAGGTGATGATAGGCTCGTGACGGCCATCAGCTCCATGGACTTAGAGCGCCCTGGAGACGGCAAGTGCCAGCCGGT  | 450  |
| W L V L Q V M I G S C T A I S S M D L E R P G D G K C Q P V                               |      |
| GGAGATTCCCATGTGCAAGGACATCGGCTACAACACCACCGCATGCCAACCTGATGGGTACGAGAACCAGCGCGAGGCGCCATCCA    | 540  |
| E I P M C K D I G Y N T T R M P N L M G H E N Q R E A A I Q                               |      |
| ACTGCACGAGTTCGCGCGCTCGTGGAGTACGGCTGCCACAGCCACCTTCGCTTCTTCTGTGTTCGCTGTACGCGCCCATGTGCACCGA  | 630  |
| L H E F A P L V E Y G C H S H L R F F L C S L Y A P M C T E                               |      |
| GCAGGTCTCCACACCCATCCCTGCTTGC6GGTCATGTGCGAGCAGGCGCGCTCAAGTGCTCGCCGATCATGGAGCAGTTCAAATTCAG  | 720  |
| Q V S T P I P A C R V M C E Q A R L K C S P I M E Q F K F R                               |      |
| GTGGCCGACTCCCTGGATTGCAGCAAGCTCCCAACAAGAAGCACCCTAACCTGTGCATGGAGGACCCCAACAGGCTCGGATGA       | 810  |
| M P D S L D C S K L P N K N D P N Y L C M E A P N N G S D E                               |      |
| GCCAGCGGGGCTCTGGCATGTTTCTCCGCTCTTCAGGCCCCAGAGGCCCCACAGCGCGCAGGAGCACCCTAAAGGAGGGGGTCC      | 900  |
| P S R G S G M F P P L F R P Q R P H S A Q E H P L K D G G P                               |      |
| GGGGCGCGCAGGTGTGACAACCCAGGCAAGTTCACCATGTGGAGAAGAGCGAATCTTGGCACCCTTTGCACTCGGGGGTGGATGT     | 990  |
| G R A G C D N P G K F H H V E K S E S C A P L C T P G V D V                               |      |
| GTATTGGAGCGCGACGACAAGCGCTTCGCTGTGGTCTGGCTGGCCATCTGGTCCGTGCTGTGCTTCTTCTCCAGCGCTTCACCGTGT   | 1080 |
| Y W S R D D K R F A V V W L A I W S V L C F F S S A F T V L                               |      |
| CACCTTCTCATCGACCATCGCGCTTCAGGTACCCGAACGTCTATCATCTTCTCTCATGTGCTACTGCGTTTATTCGGTGGGCTA      | 1170 |
| T F L I D P S R F R Y P E R P I I F L S M C Y C V Y S V G Y                               |      |
| TATCATCGGCTCTTCGGGGCGCGGAGAGCATCGCTGTGACCGGGACAGTGGGCAGTGTATGTTATCCAGGAAGGACTGGAGAGCAC    | 1260 |
| I I R L F A G A E S I A C D R D S G Q L Y V I Q E G L E S T                               |      |
| GGGCTGTACTTAGTCTTCTGGTACTTTACTACTTCGGCATGGCCAGCTCTTATGGTGGGTGGTCTCACCTCACTTGGTTCTTGGC     | 1350 |
| G C T L V F L V L Y Y F G H A S S L W W V V L T L T W F L A                               |      |
| TGCTGGAAAGAAGTGGGGCATGAGGCCATTGAAGCCAACAGCAGTACTTTACCTGGCAGCTTGGGCCATCCCGCTGTGAAGACTAT    | 1440 |
| A G K K W G H E A I E A N S S Y F H L A A W A I P A V K T I                               |      |
| CTTGATCTTGGTATCCGAGGGTGGCAGGGATGAGCTCACTGGTGTGTGTATGTGGCAGCATGGATGTCAATGCTCTGACCGGCTT     | 1530 |
| L I L V M R R V A G D E L T G V C Y V G S M D V N A L T G F                               |      |
| CGTGTGTGTCGCTGGCTTGTCTACCTAGTCATCGGCACCTTCCTTCATCTGTCCGGCTTTGTGGCTTTATTCACATCCGGAGGTTGAT  | 1620 |
| V L V P L A C Y L V I G T S F I L S G F V A L F H I R R V M                               |      |
| GAAACCGGTGGGGAGAACACGGACAAGCTGGAGAAGCTCATGGTACGCATAGGGTCTTCTCCCTCTCTACACTGTGCGGGCCACCTG   | 1710 |
| K T G G E N T D K L E K L M V R Y G V F S L L Y T V P A T C                               |      |
| TGTGATTGCGTCTATTTTATGAACGCTCAACATGCACTACTGGAAGATGCTGGCCACCCAGCACAAAGTGAAGATGAACATCAGAC    | 1800 |
| V I A C Y F Y E R L N M D Y W K M L A Y Q H K C K M N N Q T                               |      |
| CAAGACACCTGACTGCCTGATGACCACCTCCATCCCTGCGGTGGAGGTCTTCATGGTCAAAGTGCCATGCTGCTGGTGGTGGGCATCAC | 1890 |
| R T P D C L M T T S I P A V E V F M V R V S M L L V V G I T                               |      |
| CAGTGGGGTGTGGGTCTGGACTTCAAGACCCTGCAGTCTGGCAACACGTATGCAGCGGGGGCTAAAGAGAAAAAGCCGGAGGAAACC   | 1980 |
| S G V W V W Y S K T L Q S W Q H V C S R G L K R K S R R R P                               |      |
| AGCCAGTGTGGTCAACAGTGCAGGGATCTACAAAAAGCCAGCACCCTCAAAACCTCACCCTGGGAAGTATGAAGTCCCCCGCCAGCC   | 2070 |
| A S V V Y S A G I Y K K A Q H P Q K P H L G K Y E L P A Q P                               |      |
| TTCAGCTCGCTGTGAAGCAGAGCTGGCTGCAAGAACAGGACATTGCGAGCCCAATGGGCAGCTTTCTTGGTTGGCTGTTGTTGGT     | 2160 |
| S A C V STOP  |      |
| AAATCAAAGTAAAAAGATATGTATATATATACATGTATGTGTATGCATGTGCATATATATGCATATATTACACATACATGAAGTCT    | 2250 |
| ACCTTGAGGTTCAGAACAGCTGAATGTAAAGGGTCTGTTCAGTTTGTGCTCCCTGAAGGTCGCTCATTAAAGAGGGAGCTCTTGT     | 2340 |
| GTAACATATTTGTGGTAAAGTAGTTGATTCACCCGCTCCAGAAAACCTTTGTTTAGCCCTCAGCAGACAGCTGTGATTAGAAAGGC    | 2430 |
| TTTGCTGCTGTGCATAAAGTTCAGGCTGGAGAGCTCTTTGTAAAGCTAAAGAGCTTTCTGGGGGGGGGGGAGCCAGTGAAGCCACC    | 2520 |
| AAGGGCATGCTCTCCCTCCCTCACTCCCCAGCTAGCTGCTGTATGGGTGGGAGGGAAGGTGAGGAGGAGAGGGGATAAAGAGGTGAC   | 2610 |
| ACCCCCCCCC  | 2621 |



図 2



3 / 10

3

|       |  |   |                                  |   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
|-------|--|---|----------------------------------|---|---|-----------------------------------|--------------------|------------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------|-----|
| Mfz-8 | MENG----                                     | YLLEVTSLAALAVLQR--  | SSGAAAASAKEL----                 | ACQEITVPLCKGIGYNTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEI  | 78  |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-9 | MAVPP--                                      | LRGALLWQLLATGGALE--   | IGRFDPERGRGPA--                  | PCQAMEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAQLAEFSPLVQY | 83  |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| 584   | MQHPG--                                      | PRMLVL--QVMI--  | GSCTA--                          | ISSMDLER--PGDG--                              | KCPVEIPMKDIGYNTTRMPNLMGHENQREAAIQLHEPAPLVEY | 78                                |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-4 | MAWPGTGPSSRGAPGGVGLRLGLLQF--                 | LLLLRPTLFGFDEEERRCDPIRIAMQNLGYNVTKMPNLVGHQLQDAELQLTFTPTLIQY | 88                               |   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-7 | MRPAAGEAGAGLRMLGLAALLAALLGTPCAAHHEDKAI       | SVPDHGFCQPI   | SIPLCTD                          | IAYNQTL                                       | PNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKV                   | 90                                |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-3 | MAVS----                                     | WIVFDLWLLTVPLGQIGG--  | HSLF-----                        | SCEP  | ITLRLCQDL                                   | PYNTTFMPNLLNHYDQQTAAALAMEPFPMPVNL | 71                 |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-8 | QCSPDLKFFLCSMYTPI                            | CLEDYKKLP   | PCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFANPDRMCDRL | PEQGNPDTLCMDYNRTDLT                           | TAAPSPPRLP                                  | 168                               |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-9 | GCHSHLRFFLCSLYAPMCTDQVSTPI                   | PACRPMCEQARLR   | CAPIMEQNF                        | GNPDSLD                                       | EARLP                                       | TRNDPHALCMEAPENATAGTEPHKGLCM      | 173                |                  |                 |                |                   |           |     |
| 584   | GCHSHLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPI                   | PACRVMCEQARLK   | CSPIMEQKFRNPDSLD                 | ESKLP   | KNKNPNYL                                    | CMEAPNNGSDEPSRGSGMPP              | 168                |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-4 | CCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIP                    | IGPCGGMCLSVKRRCEP   | VLREFG                           | FANPDTL                                       | NSKFP                                       | QNDHNMCEGPGDEEVLP                 | PHKPTIQPG          | 178              |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-7 | QCSAELKFFLCSMYAPVCT--                        | VLEQAIPPC   | SLCERARQCEALN                    | KFGQWPERLR                                    | CENFP                                       | VHGAGEI--                         | CVGQNTSDAPP        | PGGGAGGRGA       | 178             |                |                   |           |     |
| Mfz-3 | DCSRDFRPFLLALYAPI                            | CMYGRVTL  | CRRLC                            | QRAYSE  | SKLMEMF                                     | GVPWPEDEME                        | SRFPD-----         | CDEP             | YPRLDNLVGDPTGA  | 153            |                   |           |     |
| Mfz-8 | PPPPGEGOPPSGSGHSRPPGARPPHGGSSRGSGDAAAPP      | SRGGKARPPGGGAAPCEPGCCRAPMVS                                 | SSSERHPLYNRVKTQ                  | IANCA   | 258   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-9 | LPVAPRPARPPGDSAPGPGSGGTCDNPEKFQYVEK-----     | SRSCAPRC-----   | 216                              |   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| 584   | LFRPQRPHSAQEHPLKDGCGPRAGCDNPKFHHVEK-----     | SESCAPLC-----   | 212                              |   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-4 | EECHSVGSNSDQYIWKVR-----                      | SLNCVLKC-----   | 204                              |   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-7 | TAQPTAGYLPDLLTPPQPAAGFSFSCPRQLKVPPYLYGR----- | FLGERDCGAPC-----  | EPG                              | 231   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-3 | PVAVQRDYGFWCPRELKIDPDLGYS-----               | FLHVRDCSPPC-----  | 189                              |   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-8 | LPCHNPFFSQDERAFTVFWIGLWSVLCFVSTFATVSTFL      | IDMERFKYPERPI   | IFLSACYL                         | FVSVGYL                                       | VRLVAGHEK                                   | VACSGGAPGAGGRG                    | 348                |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-9 | GPGVEVFSRRDKDFALVMAVWSALCFSTFTVFTFL          | LEPHRFQYPERPI   | IFLSM                            | CYNVYSLAFL                                    | TRAVAGA                                     | QSVACDQE--                        | AG----             | 300              |                 |                |                   |           |     |
| 584   | TPGVDVYNSRDKRFVWVLAIVSVLCFSSAFTVLTFL         | IDPSRFYPERPI  | IFLSM                            | CYCVSVGYI                                     | IRLFAGA                                     | ESIA                              | CDRD--             | SG----           | 296             |                |                   |           |     |
| Mfz-4 | CYDAGLY--                                    | SRAKEFTD  | IYMAVWASLCF                      | ISTFTVLTFL                                    | IDSSRF                                      | SYPERPI                           | IFLSM              | CYNIYSI          | AYIVRLTVGRER    | ISCFEEAA-----  | 288               |           |     |
| Mfz-7 | RPNGLMYFKEAEVRPARLWVGWVSVLCCASTLFTVLT        | YDMRRFSYPERPI   | IFLSG                            | CYFVAVAYAA                                    | GFLLEER--                                   | VVCLERF                           | SED----            | 316              |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-3 | --PNM--                                      | YFRREELSPARFY   | IGLIS                            | ICLSATLFTLFTL                                 | IDVTRF                                      | YPERPI                            | IFYAVCYMHVSL       | IFFIG            | PLEDR--         | VACNASSPAQ---- | 271               |           |     |
| Mfz-8 | GAGGAAAAGAGAAGRGASSPGARGEYELGAVEQHVR         | YETTG   | PALCTV                           | VFLVYFF                                       | GMASSIWVIL                                  | SLTWPLAAGMKNGNEA                  | IAGYSQY            | 438              |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-9 | -----  | ALYV  | IQEGL--                          | ENTG--  | CTLV  | FLLYYFGMASSLWVVL                  | TLTWPLAAGKNGHEA    | IEAHGSY          | 358             |                |                   |           |     |
| 584   | -----  | QLYV  | IQEGL--                          | ESTG--  | CTLV  | FLVLYYFGMASSLWVVL                 | TLTWPLAAGKNGHEA    | IEANSY           | 354             |                |                   |           |     |
| Mfz-4 | -----  | EPV   | IQEGL--                          | KNTG--  | CAT   | IFLLMYFGMASSIWVIL                 | TLTWPLAAGKNGHEA    | IEHSSY           | 346             |                |                   |           |     |
| Mfz-7 | -----  | CYRT  | VAQT--                           | KKEG--  | CTL   | FLMYFGMASSIWVIL                   | SLTWPLAAGKNGHEA    | IEANSY           | 374             |                |                   |           |     |
| Mfz-3 | -----  | YKAST   | VTQGS--                          | HNKA--  | CTL   | FLVLYYFTNAGSVWVIL                 | TLTWPLAAVPRNGSEA   | IEKALL           | 330             |                |                   |           |     |
| Mfz-8 | FHLAANLVP                                    | SVKSI   | AVLAL                            | SSVDGP  | VAGICV                                      | YVGNQSLDNL                        | RGVFLAPL           | VLYL             | IGTMPLLAGFVSL   | FRIRSVIKQCGPTK | THKLEKLM          | 528       |     |
| Mfz-9 | FHMAANGLP                                    | AKTIV   | VLTL                             | RKVGDEL                                       | TGLCY                                       | VASMDPAAL                         | TGFVL              | PVLS             | CYLVLGTS        | PLLTGF         | VALFHIRKIMKTGGT-- | NTEKLEKLM | 446 |
| 584   | FHLAANLPAVKTIL                               | ILVHRVAGDEL   | TGVCYVGSMDV                      | NAL   | TGFVL                                       | PVPLAC                            | YVIGTS             | FILSGF           | VALFHIRVMTGGE-- | NTDKLEKLM      | 442               |           |     |
| Mfz-4 | FHLAANLPAVKTIV                               | ILVRLVDADEL   | TGLCYVGNQ                        | NLDAL   | TGFVAPL                                     | PVYVIG                            | TLFIAAGL           | VALFKIRSNLQDGT-- | KTDKLERLM       | 434            |                   |           |     |
| Mfz-7 | FHLAANLPAVKTIT                               | ILANGQVDG   | DLVSGVCYVGI                      | YSVDSL  | RGVFLAPL                                    | PVYVIG                            | TLFIAAGL           | VALFKIRSNLQDGT-- | KTEKLEKLM       | 462            |                   |           |     |
| Mfz-3 | FHASANGIPGTLT                                | ITILLANKIEG   | DNISGV                           | CFVGLYD                                       | VALRYF                                      | VLAPL                             | CYVVGVSLL          | LAGITSLNRV       | IEI             | PLEKE--        | NQDKLVKFM         | 418       |     |
| Mfz-8 | IRLGLFTVLYTPAAV                              | VVACLFYEQHNR  | PRWEAT--                         | HNCPL   | RDLQPDQAR-----                              | RPDYAV                            | FMLKYF             | MCLVVG           | ITSGVWVWSGK     | TL             | 609               |           |     |
| Mfz-9 | VKIGVFSILYTPATCV                             | IVCYVYERL   | NMDP                             | WRLRATE                                       | QPC   | TAATVPGGR                         | DCSLPGGS           | VPTVAV           | FMLKIP          | HSLLVVG        | ITSGVWVWSK        | TPQ       | 536 |
| 584   | VRIGVFSILYTPATCV                             | IACVYERL  | NMDYWK                           | MLATQHKCKMNN--                                | QTKTPDC--                                   | LHTTS                             | IPAVE              | FVFKVSHLLVVG     | ITSGVWVWSK      | TLQ            | 530               |           |     |
| Mfz-4 | VKIGVFSVLYTPATCV                             | IACVYERL  | NMDYWK                           | MLATQHKCKMNN--                                | QTKTPDC--                                   | LHTTS                             | IPAVE              | FVFKVSHLLVVG     | ITSGVWVWSK      | TLQ            | 530               |           |     |
| Mfz-7 | VRIGVFSVLYTPATCV                             | IACVYERL  | NMDYWK                           | MLATQHKCKMNN--                                | QTKTPDC--                                   | LHTTS                             | IPAVE              | FVFKVSHLLVVG     | ITSGVWVWSK      | TLQ            | 530               |           |     |
| Mfz-3 | IRIGVFSILYLVPLLV                             | VIGCYVYERL  | NMDYWK                           | MLATQHKCKMNN--                                | QTKTPDC--                                   | LHTTS                             | IPAVE              | FVFKVSHLLVVG     | ITSGVWVWSK      | TLQ            | 530               |           |     |
| Mfz-8 | SWRALCT--                                    | RCCWASKGA   | AVGAGAGGSGPGGSGPGGGGGHGGGGGLSY   | SDVSTGL                                       | TWRS  | SGTASSV                           | SYPKQMP            | LSQV             | 685             |                |                   |           |     |
| Mfz-9 | TWQSLCY--                                    | RKMAAGR   | ARAKACRTPGGYGRGTHCHYKAPT         | VVLHMTK                                       | TDPS  | LENTHL                            | 592                |                  |                 |                |                   |           |     |
| 584   | SWQHVCS--                                    | RGLKRKS   | BRKPA                            | SVVTSAGIYKKAQHP                               | QKPHLCKYELPAQPSACV                          | 582                               |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-4 | TWQK--                                       | CSNRLV  | NSCKVKREKRGNGVVKPGKGNETV         | 537   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-7 | SWRRFYH--                                    | RLSTG   | SKGETAV                          | 567   |   |                                   |                    |                  |                 |                |                   |           |     |
| Mfz-3 | EWASPFHGR                                    | KKIEIVNES   | RQVLQEPDFAQSL                    | LRDPNTP                                       | IIRKSGT                                     | STQGTSTHASSTQLAMVD                | QBSKAGSVHSKVSSYHGS | LHRSRDG          | 595             |                |                   |           |     |
| Mfz-3 | RYTPCSYRGMEERL                               | PHGMSRL   | TDHSHSSSHRLNEQSRHSS              | IRDL  | SNNP  | THITHGTS                          | MNRVIEED           | CSA              | 666             |                |                   |           |     |

4/10

図 4

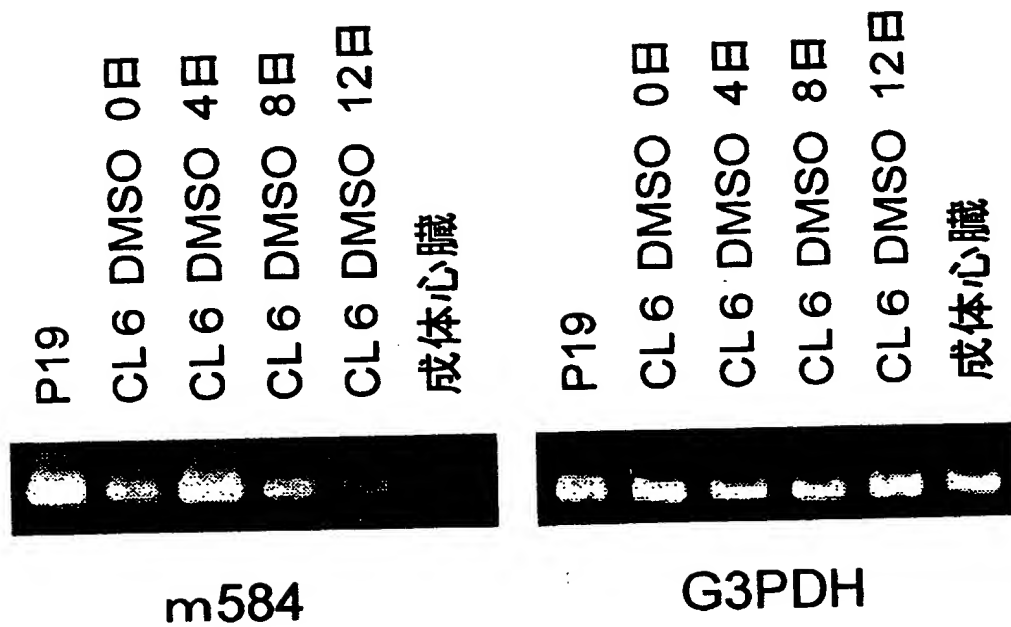
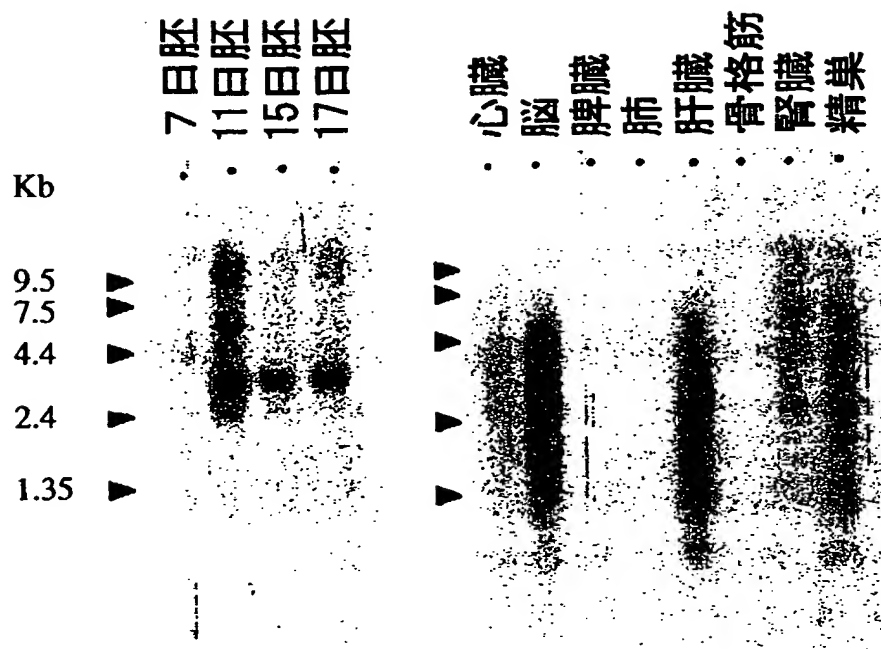


图 5



6 / 10

☒ 6

|   |      |
|---|------|
| TTAAGGGCCGCCGGGCARGTTCAAACCTCGAAACAGCTGCCGGCTGGTCCCGGCCGAGGCCGGCGCAGGGAGGRAKGASCCGCCCGGT  | 90   |
| CTGTGGGGGGSGCCGCGARKTGGGCAGGCCTCGGTGTGCCCGCGCCGCGAGCCCGCTCCAGACGCCACCTGGGCGCTCCAAGAAGAGGC | 180  |
| CGAAGTTTGCCCGGCCGTGAGTTGGAGCTCGCCCGGGCCGTTGCCCGGGAGCTCCGGGGGCTTCCCTCGCTTCCCGGTATTGTTTGC   | 270  |
| AAACTTTGCTGCTCTCCGCCCGGCCCAACTCGGCGGACGCCGGCGCGGAGAGCCGAGCCGGGGGCGCTGTGCGCAGCGCTCGGGCC    | 360  |
| AGGCCGGGCGGGCATGGCGGGGGCCCGAGCAGGGGTGGAGAGCGGGGCCAGCAGCAGCCGTGCCCGGAGCGGGCGCTGAGGGGC      | 450  |
| GCGGAGCTCCCCGCGAGGACAGTCCAACGCCAGCATGCAGCGCCCGGGCCCCCGCTGTGGCTGGTCTGCAGGTGATGGGCTCGTGCG   | 540  |
| M Q R P G P R L W L V L Q V M G S C A   |      |
| CCGCCATCAGCTCCATGGACATGGAGCGCCGGGCGAGCGCAATGCCAGCCATCGAGATCCCGATGTGCAAGGACATCGGTACAACA    | 630  |
| A I S S M D M E R P G D G K C Q P I E I P M C K D I G Y N M                               |      |
| TGACTCGTATGCCAACCTGATGGGCCACGAGAACCAGCGGAGGACGCCATCCAGTTGCACGAGTTCCGCCCGCTGGTGGAGTACGGCT  | 720  |
| T R M P N L M G H E N Q R E A A I Q L H E F A P L V E Y G C                               |      |
| GCCACGGCCACCTCCGCTTCTTCTGTGCTCGCTGTACGCGCCGATGTGCACCGAGCAGGTCTCTACCCCATCCCGCCTGCCGGGTCA   | 810  |
| H G H L R F F L C S L Y A P M C T E Q V S T P I P A C R V M                               |      |
| TGTGCGAGCAGGCCCGGTCAAGTGCTCCCGATTATGGAGCAGTTCAACTTCAAGTGGCCGACTCCCTGGACTGCCGAAACTCCCCA    | 900  |
| C E Q A R L K C S P I M E Q F N F K W P D S L D C R K L P N                               |      |
| ACAAGAACGACCCCACTACCTGTGCATGGAGGCGCCAACAACGGCTCGGACGAGCCACCCGGGGCTCGGGCTGTTCCCGCGCTGT     | 990  |
| K N D P N Y L C M E A P N N G S D E P T R G S G L F P P L F                               |      |
| TCCGGCCCGAGCGGCCACAGCGCGCAGGAGCACCCTGAAGGACGGGGGCCCGGGCGCGCGCTGCGACAACCGGGCAAGTTCC        | 1080 |
| R P Q R P H S A Q E H P L K D G G P G R G G C D N P G K F H                               |      |
| ACCACGTGGAGAAGAGCGCGTGTGCGCGCCGCTCTGCACGCCCGCGTGGACGTGTACTGGAGCCGCGAGGACAAGCGCTTCGACGTGG  | 1170 |
| H V E K S A S C A P L C T P G V D V Y W S R E D K R F A V V                               |      |
| TCTGGCTGGCCATCTGGGCGGTGCTGTGCTTCTTCTCCAGCGCCTTACCCTGCTCACCTTCTCATCGACCCGGCCGCTTCCGCTACC   | 1260 |
| W L A I W A V L C F F S S A F T V L T F L I D P A R F R Y P                               |      |
| CCGAGCGCCCATCATCTTCTCTCCATGTGCTACTGCGTCTACTCCGTGGGCTACCTCATCCGCCTCTCGCCGGCGCCGAGAGCATCG   | 1350 |
| E R P I I F L S M C Y C V Y S V G Y L I R L F A G A E S I A                               |      |
| CCTGCGACCGGACAGCGCCAGCTCTATGTCATCCAGGAGGACTGGAGAGCACCGBCTGCACGCTGGTCTTCTGGTCTCTACTACT     | 1440 |
| C D R D S G Q L Y V I Q E G L E S T G C T L V F L V L Y Y F                               |      |
| TCGGCATGGCCAGCTCGCTGTGGTGGGTGGTCTCACGCTCACCTGTTCTTGGCCGCGGCAAGAAGTGGGGCCACGAGCCATCGAAG    | 1530 |
| G M A S S L W W V V L T L T W F L A A G K K W G H E A I E A                               |      |

7/10

☒ 7

CCAACAGCAGCTACTTCCACCTGGCAGCCTGGGCCATCCCGCGGTGAAGACCATCCTGATCCTGGTCATGCGCAGGGTGGCGGGGACG 1620  
N S S Y F H L A A W A I P A V K T I L I L V M R R V A G D E  
AGCTACCGGGGTCTGCTACGTGGGCAGCATGGACGTCAACGCGCTCACCGGCTTCGTGCTCATTCCCCTGGCCTGCTACCTGGTCATCG 1710  
L T G V C Y V G S M D V N A L T G F V L I P L A C Y L V I G  
GCACGTCCTTCATCCTCTCGGGCTTCGTGGCCCTGTTCCACATCCGAGGGTGATGAAGACGGGCGGCGAGAACACGGACAAGCTGGAGA 1800  
T S F I L S G F V A L F H I R R V M K T G G E N T D K L E K  
AGCTCATGGTGGCTATCGGCTCTTCTGTGCTGTACACCGTGCCGGCCACCTGTGTGATCGCCTGCTACTTTTACGAACCCCTCAACA 1890  
L M V R I G L F S V L Y T V P A T C V I A C Y F Y E R L N M  
TGGATTACTGGAAGATCCTGGCGCGCAGCACAAGTGCAAAATGAACAACCAGACTAAAACGCTGGACTGCCTGATGGCCGCTCCATCC 1980  
D Y W K I L A A Q H K C K M N N Q T K T L D C L M A A S I P  
CCGCCGTGGAGATCTTCATGGTGAAGATCTTTATGCTGCTGGTGGTGGGATCACCAGCGGGATGTGGATTGGACCTCAAGACTCTGC 2070  
A V E I F M V K I F M L L V V G I T S G M W I W T S K T L Q  
AGTCCTGGCAGCAGGTGTGTCAGCCGTAGGTTAAAGAAGAAGAGCCGGAGAAAACCGCCAGCGTGATCACCAGCGGTGGGATTTACAAAA 2160  
S W Q Q V C S R R L K K K S R R K P A S V I T S G G I Y K K  
AAGCCCAGCATCCCCAGAAAACCTACCACGGGAAATATGAGATCCCTGCCAGTCGCCACCTGCGTGTGAACAGGGCTGGAGGGAAGGG 2250  
A Q H P Q K T H H G K Y E I P A Q S P T C V STOP  
CACAGGGGCGCCCGGAGCTAAGATGTGGTGCTTTTCTTGGTGGKTTTTCTTCTTCTTCTTTTATATAAAAGCAAAAGAG 2340  
AAATACATAAAAAAGTGTTTACCTGAAATTCAGGATGCTGTGATACACTGAAAGGAAAAATGTACTTAAAGGGTTTGTGTTTGG 2430  
TTTTCCAGCGAAGGAAGCTCCTCCAGTGAAGTAGCCTCTTGTGTAATAATTGTGGTAAAGTAGTTGATTACGCCCTCAGAAGAAAAC 2520  
TTTTGTTTAGAGCCCTCCGTAATATACATCTGTGATTTGAGTTGGCTTTGCTACCCATTTACAAATAAGAGGACAGATACTGCTTTG 2610  
CAAATTCAAGAGCCTCCCTGGGTTAACAAATGAGCCATCCCAGGGCCACCCCAAGGAAGGCCACAGTGCTGGCGGCATCCCTGCAG 2700  
AGGAAAGACAGGACCCGGGCCCCCTCACACCCAGTGGATTGGAGTTGCTTAAATAGACTCCGGCCTTACCAATAGTCTCTCTGC 2790  
AAGACAGAAACCTCCATCAACCTCACATTTGTGAACCTCAAACGATGTGCAATACATTTTTTCTCTTCTTCTTGAATAAAAGAGAAA 2880  
CAAGTATTTTGTATATATAAAGACAACAAAGAAATCTCCTAACAAAGAACTAAGAGGCCAGCCCTCAGAAACCTTCAGTGCTACA 2970  
TTTTGTGGCTTTTTAATGGAACCAAGCCAATGTTATAGACGTTTGGACTGATTGTGGAAGGAGGGGGAAGAGGGAGAAGGATCATT 3060  
CAAAAGTTACCCAAAGGCTTATTGACTCTTCTATTGTTAAACAAATGATTTCCACAAACAGATCAGGAAGCACTAGGTTGGCAGAGAC 3150  
ACTTTGTCTAGTGATTCTCTTACAGRCCAGGAAAGAGTGGKTTCTGCTGTGTATATTGTAATATATGATATTTTCATGCTCCAC 3240  
TATTTTATTAATAAAATATGTTCTTT 3269

8 / 1 0

図 8

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| m584; | <u>MQHPGPRLWLVLQVMIGSCTAISSMDLERPGDGKCQPVEIPMCKDIGYNTTRMPNLMGHE</u>                                  | 60  |
|       | **.*****.***.*****.*****.*****.*****.*****   |     |
| h584; | <u>MQRPGPRLWLVLQVM-GSCAAISSMDMERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNTTRMPNLMGHE</u>                                  | 59  |
| m584; | <u>NQREAAIQLHEFAPLVEYGCHSHLRFFLC<sub>SLY</sub>APMCTEQVSTPIPACRV<sub>MCE</sub>QARLK<sub>CSP</sub></u> | 120 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>NQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGLRFFLC<sub>SLY</sub>APMCTEQVSTPIPACRV<sub>MCE</sub>QARLK<sub>CSP</sub></u>  | 119 |
| m584; | <u>IMEQFKFRWPDSLDCSKLPNKNDPNYLCMEAPNNGSDEPSRGSGMFPPLFRPQRP<sub>HPHSAQE</sub></u>                     | 180 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>IMEQFNFKWPDSLDCRKL<sub>PNKNDPNYLC</sub>MEAPNNGSDEPTRGSGLPPLFRPQRP<sub>HPHSAQE</sub></u>           | 179 |
| m584; | <u>HPLKGGPGRAGCDNPGKFHHVEKSESCAPLCTPGVDVYWSRDDKRF<sub>AVVWLAIWSVLCF</sub></u>                        | 240 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>HPLKGGPGRGGCDNPGKFHHVEKSASCAPLCTPGVDVYWSREDKRF<sub>AVVWLAIWAVLCF</sub></u>                        | 239 |
| m584; | <u>FSSAFTVLTFLIDPSRFRYPERP<sub>II</sub>FLSMCYCVSVGYIIRLFAGAESIACDRD<sub>SGQLYV</sub></u>             | 300 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>FSSAFTVLTFLIDPARFRYPERP<sub>II</sub>FLSMCYCVSVGYLIRLFAGAESIACDRD<sub>SGQLYV</sub></u>             | 299 |
| m584; | <u>IQEGLESTGCTLVFLVLYYFGMASSLWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEANSSY<sub>FHLAAW</sub></u>                        | 360 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>IQEGLESTGCTLVFLVLYYFGMASSLWVVLTLTWFLAAGKKWGHEAIEANSSY<sub>FHLAAW</sub></u>                        | 359 |
| m584; | <u>AIPAVKTILILVMRRVAGDELTVGCYVGSMDVNALTGFVLVPLACYLVIGTSF<sub>ILSGFVA</sub></u>                       | 420 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>AIPAVKTILILVMRRVAGDELTVGCYVGSMDVNALTGFVL<sub>I</sub>PLACYLVIGTSF<sub>ILSGFVA</sub></u>            | 419 |
| m584; | <u>LFHIRRMKTGGENTDKLEKLMVRIGVFSLLYTVPATCVIACYFYERLNMDYWK<sub>FLATQH</sub></u>                        | 480 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>LFHIRRMKTGGENTDKLEKLMVRIGLFSVLYTVPATCVIACYFYERLNMDYWK<sub>I</sub>LAAQH</u>                        | 479 |
| m584; | <u>KCKMNNQTKTPDCLMTTIPAVEVFMVKVSM<sub>LLVVGITSGV</sub>WVWTSKTLQSWQH<sub>VCSRGL</sub></u>             | 540 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>KCKMNNQTKTLDC<sub>LMAASIPAVEIFMVKIFMLLVVGITSGMW</sub>IWTSKTLQSWQ<sub>QVCSRRL</sub></u>            | 539 |
| m584; | <u>KRKSRRKPASVVT<sub>SAGIYKKAQHPQKPHL</sub>GKYELPAQPSACV</u>   | 582 |
|       | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****  |     |
| h584; | <u>KKKSRRKPASVITSGGIYKKAQHPQKTHHGKYELPAQSP<sub>TCV</sub></u>   | 581 |

9/10

図9

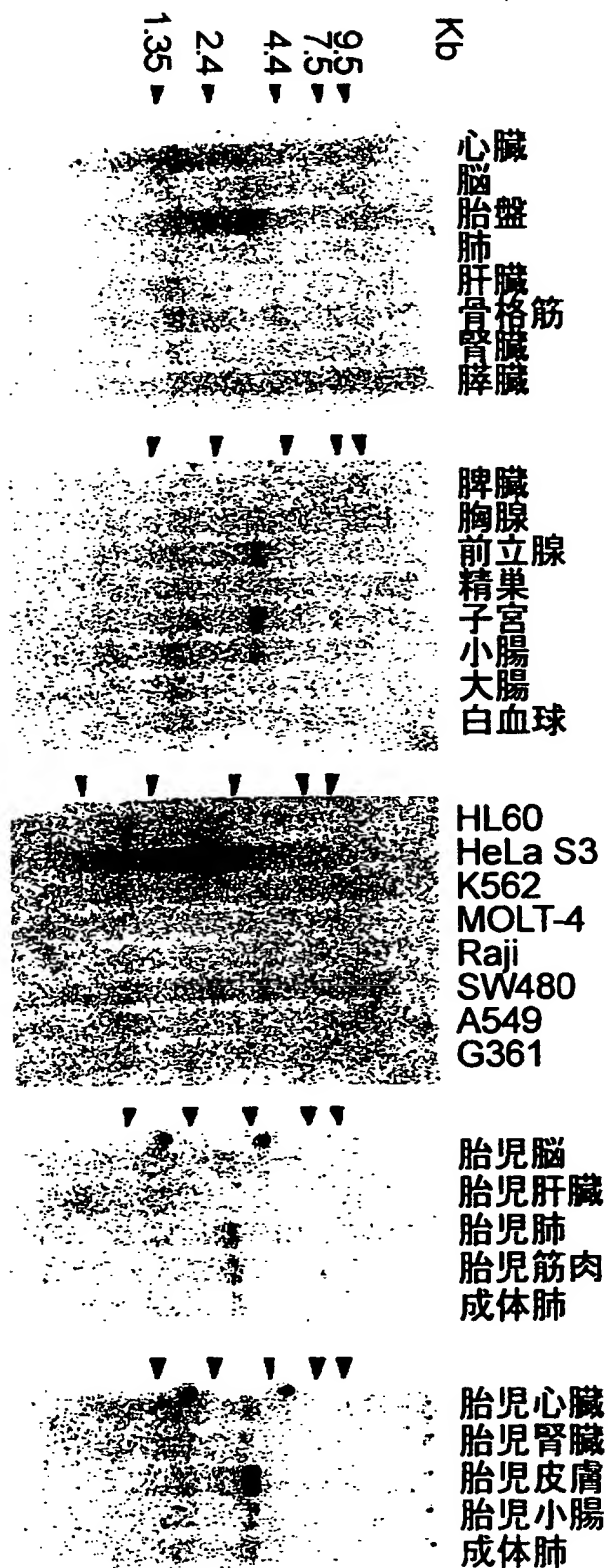
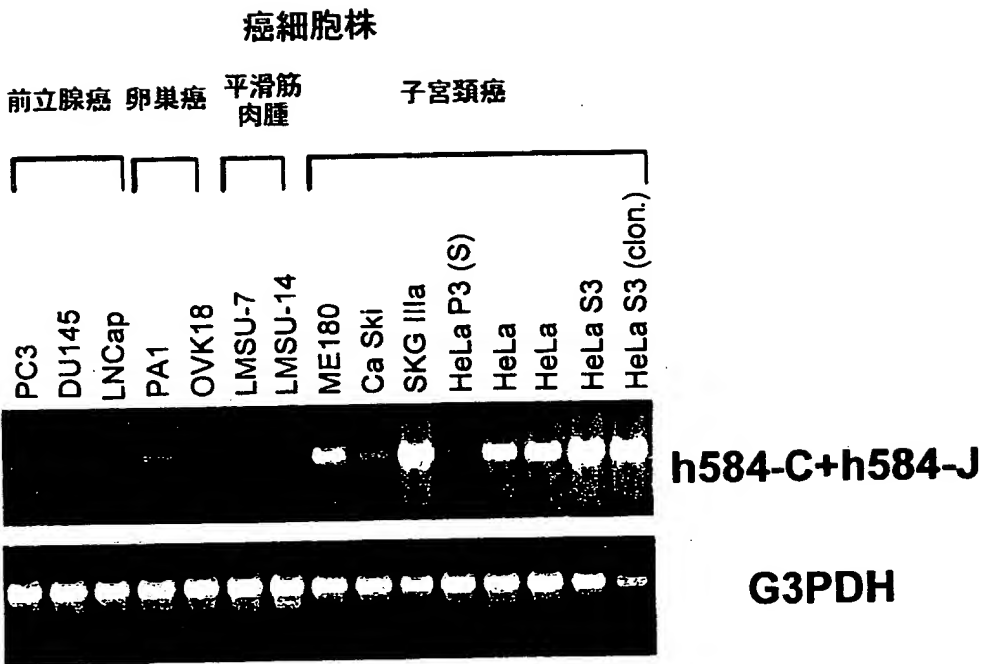




図10



1/20

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

&lt;120&gt; A novel frizzled family gene, 584

&lt;130&gt; C2-107PCT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 1999-232018

&lt;151&gt; 1999-08-18

&lt;160&gt; 27

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2621

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (338)..(2083)

&lt;400&gt; 1

cgggccgcgt cgaccagggc ctagggccac ggtgtgcccg cgctgcccc cgcggtccg 60

cgatcgcccc cgcccgaag aagaggccaa agtttgcgcg ctgagcggcg ctcgctccg 120

cgtattgttt gcaaacttcg ctcccctccc ccgcccggc cgcactccg tgaggccg 180

cgcccaccgc ggtggcccc ggccgcgga gcgctccggc cagactggat gggcatgcg 240

gggggcccga gccggggcgc ggagccgcgg gcagcagcaa cagcccgctc ccgggagcgg 300

cgccctgag cggcgctggg acattgcggg cgccacc atg caa cac ccg ggc ccg 355

Met Gln His Pro Gly Pro

1

5

cgc ctg tgg ctg gtg ctg cag gtg atg ata ggc tcg tgc acg gcc atc 403

Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Ile Gly Ser Cys Thr Ala Ile

10

15

20

agc tcc atg gac tta gag cgc cct gga gac ggc aag tgc cag ccg gtg 451

Ser Ser Met Asp Leu Glu Arg Pro Gly Asp Gly Lys Cys Gln Pro Val

2 / 2 0

| 25  | 30  | 35  |      |
|---|-----|-----|------|
| gag att ccc atg tgc aag gac atc ggc tac aac acc acc cgc atg ccc |     |     | 499  |
| Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn Thr Thr Arg Met Pro |     |     |      |
| 40  | 45  | 50  |      |
| aac ctg atg ggt cac gag aac cag cgc gag gcg gcc atc caa ctg cac |     |     | 547  |
| Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala Ala Ile Gln Leu His |     |     |      |
| 55  | 60  | 65  | 70   |
| gag ttc gcg cgc ctc gtg gag tac ggc tgc cac agc cac ctt cgc ttc |     |     | 595  |
| Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His Ser His Leu Arg Phe |     |     |      |
| 75  | 80  | 85  |      |
| ttc ctg tgt tgc ctg tac gcg ccc atg tgc acc gag cag gtc tcc aca |     |     | 643  |
| Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr Glu Gln Val Ser Thr |     |     |      |
| 90  | 95  | 100 |      |
| ccc atc cct gct tgc cgg gtc atg tgc gag cag gcc cgg ctc aag tgc |     |     | 691  |
| Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln Ala Arg Leu Lys Cys |     |     |      |
| 105   | 110 | 115 |      |
| tgc ccg atc atg gag cag ttc aaa ttc agg tgg ccg gac tcc ctg gat |     |     | 739  |
| Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Lys Phe Arg Trp Pro Asp Ser Leu Asp |     |     |      |
| 120   | 125 | 130 |      |
| tgc agc aag ctc ccc aac aag aac gac ccc aac tac ctg tgc atg gag |     |     | 787  |
| Cys Ser Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn Tyr Leu Cys Met Glu |     |     |      |
| 135   | 140 | 145 | 150  |
| gca ccc aac aac ggc tgc gat gag ccc agc cgg ggc tct ggc atg ttt |     |     | 835  |
| Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Ser Arg Gly Ser Gly Met Phe |     |     |      |
| 155   | 160 | 165 |      |
| cct ccg ctc ttc agg ccc cag agg ccc cac agc gcg cag gag cac cca |     |     | 883  |
| Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser Ala Gln Glu His Pro |     |     |      |
| 170   | 175 | 180 |      |
| cta aag gac ggg ggt ccg ggg cgc gca ggt tgt gac aac cca ggc aag |     |     | 931  |
| Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly Cys Asp Asn Pro Gly Lys |     |     |      |
| 185   | 190 | 195 |      |
| ttc cac cat gtg gag aag agc gaa tct tgc gca ccg ctt tgc act ccg |     |     | 979  |
| Phe His His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys Ala Pro Leu Cys Thr Pro |     |     |      |
| 200   | 205 | 210 |      |
| ggg gtg gat gtg tat tgg agc cgc gac gac aag cgc ttc gct gtg gtc |     |     | 1027 |
| Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Asp Asp Lys Arg Phe Ala Val Val |     |     |      |

3/20

|   |      |     |     |  |
|---|------|-----|-----|--|
| 215   | 220  | 225 | 230 |  |
| tgg ctg gcc atc tgg tcc gtg ctg tgc ttc ttc tcc agc gcc ttc acc | 1075 |     |     |  |
| Trp Leu Ala Ile Trp Ser Val Leu Cys Phe Phe Ser Ser Ala Phe Thr |      |     |     |  |
| 235   | 240  | 245 |     |  |
| gtg ctc acc ttc ctc atc gac cca tcg cgc ttc agg tac ccc gaa cgt | 1123 |     |     |  |
| Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ser Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg |      |     |     |  |
| 250   | 255  | 260 |     |  |
| cct atc atc ttc ctc tcc atg tgc tac tgc gtt tat tcg gtg ggc tat | 1171 |     |     |  |
| Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys Val Tyr Ser Val Gly Tyr |      |     |     |  |
| 265   | 270  | 275 |     |  |
| atc atc cgc ctc ttc gcg ggc gcg gag agc atc gct tgt gac cgg gac | 1219 |     |     |  |
| Ile Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser Ile Ala Cys Asp Arg Asp |      |     |     |  |
| 280   | 285  | 290 |     |  |
| agt ggg cag ctg tat gtt atc cag gaa gga ctg gag agc acg ggc tgt | 1267 |     |     |  |
| Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly Leu Glu Ser Thr Gly Cys |      |     |     |  |
| 295   | 300  | 305 | 310 |  |
| acc tta gtc ttc ttg gta ctt tac tac ttc ggc atg gcc agc tct tta | 1315 |     |     |  |
| Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe Gly Met Ala Ser Ser Leu |      |     |     |  |
| 315   | 320  | 325 |     |  |
| tgg tgg gtg gtc ctc acc ctc act tgg ttc ctg gct gct gga aag aag | 1363 |     |     |  |
| Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Gly Lys Lys |      |     |     |  |
| 330   | 335  | 340 |     |  |
| tgg ggc cat gag gcc att gaa gcc aac agc agc tac ttt cac ctg gca | 1411 |     |     |  |
| Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser Tyr Phe His Leu Ala |      |     |     |  |
| 345   | 350  | 355 |     |  |
| gct tgg gcc atc ccg gct gtg aag act atc ttg atc ttg gtg atg cgc | 1459 |     |     |  |
| Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Leu Ile Leu Val Met Arg |      |     |     |  |
| 360   | 365  | 370 |     |  |
| agg gtg gca ggg gat gag ctc act ggt gtg tgt tat gtg ggc agc atg | 1507 |     |     |  |
| Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val Cys Tyr Val Gly Ser Met |      |     |     |  |
| 375   | 380  | 385 | 390 |  |
| gat gtc aat gct ctg acc ggc ttc gtg ctg gtc ccg ctg gct tgc tac | 1555 |     |     |  |
| Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu Val Pro Leu Ala Cys Tyr |      |     |     |  |
| 395   | 400  | 405 |     |  |
| cta gtc atc ggc act tcc ttc atc ctg tcc ggc ttt gtg gct tta ttc | 1603 |     |     |  |
| Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser Gly Phe Val Ala Leu Phe |      |     |     |  |

4/20

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| 410   | 415 | 420 |      |
| cac atc cgg agg gtg atg aaa acg ggt ggg gag aac acg gac aag ctg   |     |     | 1651 |
| His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly Glu Asn Thr Asp Lys Leu   |     |     |      |
| 425   | 430 | 435 |      |
| gag aag ctc atg gta cgc ata ggg gtc ttc tcc ctc ctc tac act gtg   |     |     | 1699 |
| Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe Ser Leu Leu Tyr Thr Val   |     |     |      |
| 440   | 445 | 450 |      |
| ccg gcc acc tgt gtg att gcc tgc tat ttt tat gaa cgc ctc aac atg   |     |     | 1747 |
| Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Arg Leu Asn Met   |     |     |      |
| 455   | 460 | 465 | 470  |
| gac tac tgg aag atg ctg gcc acc cag cac aag tgt aag atg aac aat   |     |     | 1795 |
| Asp Tyr Trp Lys Met Leu Ala Thr Gln His Lys Cys Lys Met Asn Asn   |     |     |      |
| 475   | 480 | 485 |      |
| cag acc aag aca cct gac tgc ctg atg acc acc tcc atc cct gcc gtg   |     |     | 1843 |
| Gln Thr Lys Thr Pro Asp Cys Leu Met Thr Thr Ser Ile Pro Ala Val   |     |     |      |
| 490   | 495 | 500 |      |
| gag gtc ttc atg gtc aaa gtg tcc atg ctg ctg gtg gtg ggc atc acc   |     |     | 1891 |
| Glu Val Phe Met Val Lys Val Ser Met Leu Leu Val Val Gly Ile Thr   |     |     |      |
| 505   | 510 | 515 |      |
| agt ggg gtg tgg gtc tgg act tcc aag acc ctg cag tcc tgg caa cac   |     |     | 1939 |
| Ser Gly Val Trp Val Trp Thr Ser Lys Thr Leu Gln Ser Trp Gln His   |     |     |      |
| 520   | 525 | 530 |      |
| gta tgc agc cgg ggg cta aag aga aaa agc cgg agg aaa cca gcc agt   |     |     | 1987 |
| Val Cys Ser Arg Gly Leu Lys Arg Lys Ser Arg Arg Lys Pro Ala Ser   |     |     |      |
| 535   | 540 | 545 | 550  |
| gtg gtc acc agt gca ggg atc tac aaa aaa gcc cag cac ccc caa aaa   |     |     | 2035 |
| Val Val Thr Ser Ala Gly Ile Tyr Lys Lys Ala Gln His Pro Gln Lys   |     |     |      |
| 555   | 560 | 565 |      |
| cct cac ctt ggg aag tat gaa ctg ccc gcc cag cct tca gcc tgc gtg   |     |     | 2083 |
| Pro His Leu Gly Lys Tyr Glu Leu Pro Ala Gln Pro Ser Ala Cys Val   |     |     |      |
| 570   | 575 | 580 |      |
| tgaaggcaga gctggctgca agaacaggac attcggagcc caaatgggca gcttttcttg |     |     | 2143 |
| gttggctggt tgttggtaaa tcaaagtaaa aagaatatgt atatatatat acatgtatgt |     |     | 2203 |
| gtatgcatgt gcatatatat gcatatatat acacatacat gaagtctacc ttgaggttca |     |     | 2263 |

5 / 2 0

gaacagctga atgtaaaggg ttctgttcag tttgttgcct ccctgaaggg tcgctcatta 2323  
 aggaggagc ctcttgtgta actaatttgt ggtaaagtag ttgattcaac cgccctccag 2383  
 aaaacttttg tttaggcctc aagcacacag ctgtgtattc agaaggttt gctgcctgtg 2443  
 cataaacttg aggctggaga gtcctttgt aagctaaaga gctttcctgg gggggggggg 2503  
 cagccagtga gccaccaag ggcattgtct ccctccctca cteccccagc taggtgtctg 2563  
 tatgggtggg agggaaggtg aggaggagag gggataaaag aggtgacacc cccccccc 2621

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 582

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

Met Gln His Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Ile  
 1 5 10 15

Gly Ser Cys Thr Ala Ile Ser Ser Met Asp Leu Glu Arg Pro Gly Asp  
 20 25 30

Gly Lys Cys Gln Pro Val Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr  
 35 40 45

Asn Thr Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu  
 50 55 60

Ala Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys  
 65 70 75 80

His Ser His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys  
 85 90 95

Thr Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu  
 100 105 110

Gln Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Lys Phe Arg  
 115 120 125

Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Ser Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro  
 130 135 140

Asn Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Ser  
 145 150 155 160

6 / 2 0

Arg Gly Ser Gly Met Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His  
 165 170 175  
 Ser Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly  
 180 185 190  
 Cys Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys  
 195 200 205  
 Ala Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Asp Asp  
 210 215 220  
 Lys Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ser Val Leu Cys Phe  
 225 230 235 240  
 Phe Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ser Arg  
 245 250 255  
 Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys  
 260 265 270  
 Val Tyr Ser Val Gly Tyr Ile Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser  
 275 280 285  
 Ile Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly  
 290 295 300  
 Leu Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe  
 305 310 315 320  
 Gly Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe  
 325 330 335  
 Leu Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser  
 340 345 350  
 Ser Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile  
 355 360 365  
 Leu Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val  
 370 375 380  
 Cys Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu  
 385 390 395 400  
 Val Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser  
 405 410 415

7 / 2 0

Gly Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly  
 420 425 430

Glu Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Val Phe  
 435 440 445

Ser Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe  
 450 455 460

Tyr Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Met Leu Ala Thr Gln His  
 465 470 475 480

Lys Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Pro Asp Cys Leu Met Thr  
 485 490 495

Thr Ser Ile Pro Ala Val Glu Val Phe Met Val Lys Val Ser Met Leu  
 500 505 510

Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Val Trp Thr Ser Lys Thr  
 515 520 525

Leu Gln Ser Trp Gln His Val Cys Ser Arg Gly Leu Lys Arg Lys Ser  
 530 535 540

Arg Arg Lys Pro Ala Ser Val Val Thr Ser Ala Gly Ile Tyr Lys Lys  
 545 550 555 560

Ala Gln His Pro Gln Lys Pro His Leu Gly Lys Tyr Glu Leu Pro Ala  
 565 570 575

Gln Pro Ser Ala Cys Val  
 580

<210> 3

<211> 3269

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (486)..(2228)

<400> 3

ttaaagggcc gcccgggcar gttcaaacct cgaaacagct gccggctggt cccggccgag 60

gccggcgcag ggaggrakga sccgcccgtt ctgtgggggs gccgcgarkt gggcaggcct 120



8/20

cggtgtgccc gcgcgccag cccgctccag acgcgccacc tgggcgtcc aagaagaggc 180  
 cgaagtttgc cgcggccgtg agttggagct cgcgccgggc cgttgcccg ggagctccgg 240  
 gggttccct cgcttcccg tattgttgc aaactttgct gctctccgc gcggcccca 300  
 actcggcgga cgcggggcgc ggagagccga gccggggcg ctgtgcgcag cgctcgggcc 360  
 aggcggggcg ggcattggcg ggggcccag caggggtgga gagccgggc cagcagcagc 420  
 ccgtgcccgg gagcggcggc gctgaggggc gcggagctcc ccgcaggac acgtccaacg 480

ccagc atg cag cgc ccg ggc ccc cgc ctg tgg ctg gtc ctg cag gtg atg 530  
 Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met  
 1 5 10 15

ggc tgc tgc gcc gcc atc agc tcc atg gac atg gag cgc ccg ggc gac 578  
 Gly Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp  
 20 25 30

ggc aaa tgc cag ccc atc gag atc ccg atg tgc aag gac atc ggc tac 626  
 Gly Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr  
 35 40 45

aac atg act cgt atg ccc aac ctg atg ggc cac gag aac cag cgc gag 674  
 Asn Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu  
 50 55 60

gca gcc atc cag ttg cac gag ttc gcg ccg ctg gtg gag tac ggc tgc 722  
 Ala Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys  
 65 70 75

cac ggc cac ctc cgc ttc ttc ctg tgc tgc ctg tac gcg ccg atg tgc 770  
 His Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys  
 80 85 90 95

acc gag cag gtc tct acc ccc atc ccc gcc tgc cgg gtc atg tgc gag 818  
 Thr Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu  
 100 105 110

cag gcc cgg ctc aag tgc tcc ccg att atg gag cag ttc aac ttc aag 866  
 Gln Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys  
 115 120 125

tgg ccc gac tcc ctg gac tgc cgg aaa ctc ccc aac aag aac gac ccc 914  
 Trp Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro  
 130 135 140

9 / 20

|   |      |
|---|------|
| aac tac ctg tgc atg gag gcg ccc aac aac ggc tcg gac gag ccc acc | 962  |
| Asn Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr |      |
| 145 150 155   |      |
| cgg ggc tcg ggc ctg ttc ccg ccg ctg ttc cgg ccg cag cgg ccc cac | 1010 |
| Arg Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His |      |
| 160 165 170 175   |      |
| agc gcg cag gag cac ccg ctg aag gac ggg ggc ccc ggg cgc ggc ggc | 1058 |
| Ser Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly |      |
| 180 185 190   |      |
| tgc gac aac ccg ggc aag ttc cac cac gtg gag aag agc gcg tcg tgc | 1106 |
| Cys Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys |      |
| 195 200 205   |      |
| gcg ccg ctc tgc acg ccc ggc gtg gac gtg tac tgg agc cgc gag gac | 1154 |
| Ala Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp |      |
| 210 215 220   |      |
| aag cgc ttc gca gtg gtc tgg ctg gcc atc tgg gcg gtg ctg tgc ttc | 1202 |
| Lys Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ala Val Leu Cys Phe |      |
| 225 230 235   |      |
| ttc tcc agc gcc ttc acc gtg ctc acc ttc ctc atc gac ccg gcc cgc | 1250 |
| Phe Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ala Arg |      |
| 240 245 250 255   |      |
| ttc cgc tac ccc gag cgc ccc atc atc ttc ctc tcc atg tgc tac tgc | 1298 |
| Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys |      |
| 260 265 270   |      |
| gtc tac tcc gtg ggc tac ctc atc cgc ctc ttc gcc ggc gcc gag agc | 1346 |
| Val Tyr Ser Val Gly Tyr Leu Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser |      |
| 275 280 285   |      |
| atc gcc tgc gac cgg gac agc ggc cag ctc tat gtc atc cag gag gga | 1394 |
| Ile Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly |      |
| 290 295 300   |      |
| ctg gag agc acc ggc tgc acg ctg gtc ttc ctg gtc ctc tac tac ttc | 1442 |
| Leu Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe |      |
| 305 310 315   |      |
| ggc atg gcc agc tcg ctg tgg tgg gtg gtc ctc acg ctc acc tgg ttc | 1490 |
| Gly Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe |      |
| 320 325 330 335   |      |

10/20

|   |      |
|---|------|
| ctg gcc gcc ggc aag aag tgg ggc cac gag gcc atc gaa gcc aac agc | 1538 |
| Leu Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser |      |
| 340 345 350   |      |
| agc tac ttc cac ctg gca gcc tgg gcc atc ccg gcg gtg aag acc atc | 1586 |
| Ser Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile |      |
| 355 360 365   |      |
| ctg atc ctg gtc atg cgc agg gtg gcg ggg gac gag ctc acc ggg gtc | 1634 |
| Leu Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val |      |
| 370 375 380   |      |
| tgc tac gtg ggc agc atg gac gtc aac gcg ctc acc ggc ttc gtg ctc | 1682 |
| Cys Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu |      |
| 385 390 395   |      |
| att ccc ctg gcc tgc tac ctg gtc atc ggc acg tcc ttc atc ctc tcg | 1730 |
| Ile Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser |      |
| 400 405 410 415   |      |
| ggc ttc gtg gcc ctg ttc cac atc cgg agg gtg atg aag acg ggc ggc | 1778 |
| Gly Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly |      |
| 420 425 430   |      |
| gag aac acg gac aag ctg gag aag ctc atg gtg cgt atc ggg ctc ttc | 1826 |
| Glu Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Leu Phe |      |
| 435 440 445   |      |
| tct gtg ctg tac acc gtg ccg gcc acc tgt gtg atc gcc tgc tac ttt | 1874 |
| Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe |      |
| 450 455 460   |      |
| tac gaa cgc ctc aac atg gat tac tgg aag atc ctg gcg gcg cag cac | 1922 |
| Tyr Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Ile Leu Ala Ala Gln His |      |
| 465 470 475   |      |
| aag tgc aaa atg aac aac cag act aaa acg ctg gac tgc ctg atg gcc | 1970 |
| Lys Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Leu Asp Cys Leu Met Ala |      |
| 480 485 490 495   |      |
| gcc tcc atc ccc gcc gtg gag atc ttc atg gtg aag atc ttt atg ctg | 2018 |
| Ala Ser Ile Pro Ala Val Glu Ile Phe Met Val Lys Ile Phe Met Leu |      |
| 500 505 510   |      |
| ctg gtg gtg ggg atc acc agc ggg atg tgg att tgg acc tcc aag act | 2066 |
| Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp Thr Ser Lys Thr |      |
| 515 520 525   |      |

11/20

ctg cag tcc tgg cag cag gtg tgc agc cgt agg tta aag aag aag agc 2114  
 Leu Gln Ser Trp Gln Gln Val Cys Ser Arg Arg Leu Lys Lys Lys Ser  
           530                          535                          540

cgg aga aaa ccg gcc agc gtg atc acc agc ggt ggg att tac aaa aaa 2162  
 Arg Arg Lys Pro Ala Ser Val Ile Thr Ser Gly Gly Ile Tyr Lys Lys  
           545                          550                          555

gcc cag cat ccc cag aaa act cac cac ggg aaa tat gag atc cct gcc 2210  
 Ala Gln His Pro Gln Lys Thr His His Gly Lys Tyr Glu Ile Pro Ala  
           560                          565                          570                          575

cag tgc ccc acc tgc gtg tgaacagggc tggaggggaag ggcacagggg 2258  
 Gln Ser Pro Thr Cys Val  
                           580

cgcccgagc taagatgtgg tgcttttctt ggttgkgtt ttctttcttc ttctttcttt 2318

tttttttata aaagcaaaag agaaatacat aaaaaagtgt ttacctgaa attcaggatg 2378

ctgtgataca ctgaaaggaa aaatgtactt aaagggtttt gttttgtttt ggttttccag 2438

cgaagggaag ctctccagt gaagtagcct cttgtgtaac taatttgtgg taaagtagtt 2498

gattcagecc tcagaagaaa acttttgttt agagcctcc gtaaataac atctgtgtat 2558

ttgagttggc tttgctaccc atttacaat aagaggacag ataactgctt tgcaaattca 2618

agagcctccc ctgggttaac aaatgagcca tcccagggc ccacccccag gaaggccaca 2678

gtgctgggcg gcatccctgc agaggaaaga caggaccgg ggcccgctc acacccag 2738

ggatttgag ttgcttaaaa tagactcgg cttcaccaa tagtctctct gcaagacaga 2798

aacctccatc aaacctcaca tttgtgaact caaacgatgt gcaatacatt ttttctctt 2858

tccttgaaaa taaaagaga aacaagtatt ttgctatata taaagacaac aaaagaaatc 2918

tcctaacaaa agaactaaga ggcccagccc tcagaaaccc ttcagtgcta cattttgtgg 2978

ctttttaatg gaaaccaagc caatgttata gacgtttgga ctgatttgtg gaaaggaggg 3038

gggaagaggg agaaggatca ttcaaaagtt acccaaaggg cttattgact ctttctattg 3098

ttaaacaat gatttcaca aacagatcag gaagcactag gttggcagag acactttgtc 3158

tagtgtattc tcttcacagr gccaggaaag agtggkttct gcgtgtgtat atttgtaata 3218

1 2 / 2 0

tatgatattt ttcatgctcc actatatttat taaaaataaa atatgttctt t

3269

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 581

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly  
 1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly  
 20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn  
 35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala  
 50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His  
 65 70 75 80

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr  
 85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln  
 100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp  
 115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn  
 130 135 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr Arg  
 145 150 155 160

Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser  
 165 170 175

Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly Cys  
 180 185 190

Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys Ala  
 195 200 205

13/20

Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp Lys  
 210 215 220

Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ala Val Leu Cys Phe Phe  
 225 230 235 240

Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ala Arg Phe  
 245 250 255

Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys Val  
 260 265 270

Tyr Ser Val Gly Tyr Leu Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser Ile  
 275 280 285

Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly Leu  
 290 295 300

Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe Gly  
 305 310 315 320

Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu  
 325 330 335

Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser  
 340 345 350

Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Leu  
 355 360 365

Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val Cys  
 370 375 380

Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu Ile  
 385 390 395 400

Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser Gly  
 405 410 415

Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly Glu  
 420 425 430

Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Leu Phe Ser  
 435 440 445

Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr  
 450 455 460

1 4 / 2 0

Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Ile Leu Ala Ala Gln His Lys  
 465 470 475 480

Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Leu Asp Cys Leu Met Ala Ala  
 485 490 495

Ser Ile Pro Ala Val Glu Ile Phe Met Val Lys Ile Phe Met Leu Leu  
 500 505 510

Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp Thr Ser Lys Thr Leu  
 515 520 525

Gln Ser Trp Gln Gln Val Cys Ser Arg Arg Leu Lys Lys Lys Ser Arg  
 530 535 540

Arg Lys Pro Ala Ser Val Ile Thr Ser Gly Gly Ile Tyr Lys Lys Ala  
 545 550 555 560

Gln His Pro Gln Lys Thr His His Gly Lys Tyr Glu Ile Pro Ala Gln  
 565 570 575

Ser Pro Thr Cys Val  
 580

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially  
 synthesized primer sequence

<400> 5  
 tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 6  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially  
 synthesized primer sequence

15 / 20

<400> 6  
caggaaacag ctatgacc 18

<210> 7  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7  
atgaacaatc agaccaagac acct 24

<210> 8  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 8  
ttcatacttc ccaaggtgag gtt 23

<210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 9  
tcaccagtgc aggatctac aaa 23

<210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence



1 6 / 2 0

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 10

gcagtcaggt gtcttggctt gatt

24

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 11

cgaacacagg aagaagcgaa ggtg

24

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 12

gttctcgtga cccatcaggt tgg

23

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 13

atttaggtga cactataga

19

&lt;210&gt; 14

17/20

<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14  
gagattgttg ccatcaacga cc 22

<210> 15  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 15  
gttgaagtcg caggagacaa cc 22

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 16  
ggcgcgagaga gcatcgcntg 20

<210> 17  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 17

18/20

acatccatgc tgccacata rca

23

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 18

cgaccgggac agcggcca

18

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 19

ccgccaccct gcgcatgac

19

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 20

ggtgaagacc atcctgatcc tggt

24

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

19/20

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 21  
gatgacatag agctggccgc tg 22

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 22  
taatacgact cactataggg 20

<210> 23  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 23  
gcgctccatg cacaggtagtg tg 22

<210> 24  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized primer sequence

<400> 24  
atgggctggc attgcccgc gc 22

<210> 25  
<211> 22

20/20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 25

accagactaa aacgctggac tg

22

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 26

ccacaaatta gttacacaag aggc

24

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 27

gcgaggacac gtccaacgcc a

21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05552

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12Q1/02,  
C07K14/705, 16/28, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ

PIR/SWISSPROT/GENESEQ

BIOSIS/WPI/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P, X      | Biochem Biophys Res Commun, 262(1), 19 August, 1999<br>Jun Koike et al., "Molecular cloning of Frizzled-1,<br>a novel member of the Frizzled gene family", pp.39-43   | 1-13                  |
| Y         | Human Molecular Genetics, 6(3), March, 1997<br>Yu-Ker Wang et al., "A novel human homologue of the<br>Drosophila frizzled wnt receptor gene binds wingless<br>protein and is in the Williams syndrome deletion at<br>7q11.23", pp.465-472 | 1-13                  |
| Y         | Genomics, 57(2), 15 April, 1999<br>Yu-Ker Wang et al., "Characterization and expression<br>pattern of the frizzled gene Fzd9, the mouse homolog of<br>FZD9 which is deleted in Williams-Beuren syndrome",<br>pp.235-248                   | 1-13                  |
| Y         | Biochem Biophys Res Commun, 252(1), November, 1998<br>Masaru Katoh et al., "Molecular cloning, differential<br>expression, and chromosomal localization of human<br>Frizzled-1, Frizzled-2, and Frizzled-7", pp.117-122                   | 1-13                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 November, 2000 (14.11.00)Date of mailing of the international search report  
05 December, 2000 (05.12.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05552

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y         | J Biol Chem, 271(8), February, 1996<br>Yanshu Wang et al., "A Large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissuepolarity gene frizzled", pp.4468-4476 | 1-13                  |
| Y         | Biochem Biophys Res Commun, 243(2), February, 1998<br>M. Katoh et al., "Molecular cloning of human Frizzled-6", pp.622-627   | 1-13                  |
| A         | J Biol Chem, 267(35), December, 1992<br>Chan S.D. et al., "Two homologs of the Drosophila polarity gene frizzled(fz) are widely expressed in mammalian tissues", pp.25202-25207                        | 1-13                  |
| P,A       | Biochem. J., 349(3), 01 Augst, 2000<br>Ramesh A. Shivdasani et al., "Structure and expression of a novel frizzled gene isolated from the developing mouse gut", pp.829-834                             | 1-13                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12Q1/02,  
C07K14/705, 16/28, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ  
PIR/SWISSPROT/GENESEQ  
BIOSIS/WPI/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| P, X            | Biochem Biophys Res Commun, 262(1), Aug. 19 1999<br>Jun Koike et al., "Molecular cloning of Frizzled-1, a novel member of the Frizzled gene family", p. 39-43  | 1-13             |
| Y               | Human Molecular Genetics, 6(3), Mar. 1997<br>Yu-Ker Wang et al., "A novel human homologue of the Drosophila frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23", p. 465-472 | 1-13             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子



4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | Genomics, 57(2), Apr. 15 1999,<br>Yu-Ker Wang et al., "Characterization and expression pattern<br>of the frizzled gene Fzd9, the mouse homolog of FZD9 which<br>is deleted in Williams-Beuren syndrome", p. 235-248 | 1-13             |
| Y                     | Biochem Biophys Res Commun, 252(1), Nov. 1998<br>Masaru Katoh et al., "Molecular cloning, differential<br>expression, and chromosomal localization of human<br>Frizzled-1, Frizzled-2, and Frizzled-7", p. 117-122  | 1-13             |
| Y                     | J Biol Chem, 271(8), Feb. 1996<br>Yanshu Wang et al., "A Large family of putative transmembrane<br>receptors homologous to the product of the Drosophila tissue<br>polarity gene frizzled", p. 4468-4476            | 1-13             |
| Y                     | Biochem Biophys Res Commun, 243(2), Feb. 1998<br>M. Katoh et al., "Molecular cloning of human Frizzled-6",<br>p. 622-627  | 1-13             |
| A                     | J Biol Chem, 267(35), Dec. 1992<br>Chan S.D. et al., "Two homologs of the Drosophila polarity<br>gene frizzled(fz) are widely expressed in mammalian tissues"<br>p. 25202-25207                                     | 1-13             |
| P, A                  | Biochem. J., 349(3), Aug. 1 2000<br>Ramesh A. Shivdasani et al., "Structure and expression of a<br>novel frizzled gene isolated from the developing mouse gut",<br>p. 829-834                                       | 1-13             |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**